



ISSN 2226-3365

www.vestnik.nspu.ru

ВЕСТНИК Новосибирского государственного педагогического университета



*Novosibirsk State
Pedagogical University*
BULLETIN
5(15) 2013

Учредитель журнала:

ФГБОУ ВПО «Новосибирский государственный педагогический университет»

Главный редактор

Пушкарёва Е. А. д. филос. н., профессор

Заместитель главного редактора

Майер Б. О. д. филос. н., профессор

Ответственный секретарь

Агавелян Р. О. д. психол. н., профессор

Редакционная коллегия

Синенко В.Я., д. пед. наук, профессор
Богомаз С. А., д-р. психол. наук, профессор (Томск)
Зверев В. А., д. ист. наук, профессор
Айзман Р. И., д. биол. н., проф., чл-корр. МАНВШ
Просенко А. Е., д. хим. наук, профессор
Баскаков М. Б., д. мед. наук, профессор (Томск)
Трофимов В. М., д. физ-мат. наук, профессор
Ряписов Н. А., д. экон. наук, профессор
Трипольская Т. А., д. филолог. наук, профессор
Исакова Н. В., д. филос. наук, профессор

Редакционный совет

Герасёв А. Д., д. биол. наук, профессор
Абаскалова Н. П., д. пед. наук, профессор
Айзман О., д. филос., д. мед. (Стокгольм, Швеция)
Афтанас Л. И., д. мед. наук, проф., акад. РАМН
Барахтенкова Л. А., д. биол. наук, профессор
Безруких М.М., д. биол. н., проф., акад. РАО(Москва)
Бонола Анна, профессор славистики (Милан, Италия)
Вайнго Чарльз С., д. мед. н., проф. (Гейнсвилль, США)
Винокуров Ю.И., д. геогр. н., профессор (Барнаул)
Галажинский Э. В., д.псих.н., проф., акад. РАО (Томск)
Джанни Челси, д. филос., проф. (Уппсала, Швеция)
Иванова Л. Н., д. мед. наук, профессор, акад. РАН
Жафяров А. Ж., д. физ-мат. н., проф., чл-корр. РАО
Жукоцкая З.Р., д. культурол., проф.(Нижегородск)
Казин Э.М., д.биол.н., проф., акад. МАНВШ(Кемерово)
Логунов Д., н.с., (Манчестер, Великобритания)
Медведев М. А., д. мед.н., проф., акад. РАМН (Томск)
Мукатаева Ж.М., д. биол. н., (Павлодар, Казахстан)
Овчинников Ю. Э., д. физ-мат. н., профессор
Панин Л. Е., д-р мед. наук, проф., академик РАМН
Печерская Т. И., д. филол. н., профессор
Пузырев В. П., д. мед. н., проф., акад. РАМН (Томск)
Сахаров А. В., д. биол. наук, профессор
Чагин А., д. филос., н. с. (Стокгольм, Швеция)
Шошенко К. А., д. мед. наук, профессор

Электронный журнал «Вестник Новосибирского государственного педагогического университета» зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор).

ЭЛ № ФС77-50014

Основан в 2011 году, выходит 6 раз в год

Редакционно-издательский отдел:

630126, г. Новосибирск, ул. Виллюйская, д. 28, к. 22
тел. 8 (383) 244-34-50

E-mail: vestnik@nspu.ru

Номер подписан к выпуску 21.10.13

The founder

Novosibirsk State Pedagogical University

Editor-in-chief

Pushkareva E. A., Dr. of philosophical sciences, prof.

Assistant editor-in-chief

Mayer B. O., Dr. of philosophical sciences, professor

Scientific secretary

Agavelyan R. O., Dr. of psychological, professor

Editorial Board

Sinenko V. Ya, Dr. of pedagogical sciences, professor
Bogomaz S. A., Dr. of psychological sc., prof. (Tomsk)
Zverev V. A., Dr. of historical sciences, professor
Aizman R. I., Dr. of biol. sc., prof., corr-member of IASHS
Prosenko A. E., Dr. of chemical sciences, professor
Baskakov M. B., Dr. of medical sciences, prof. (Tomsk)
Trofimov V. M. Dr. of physical and mathematical sc., prof.
Ryapisov N. A. Dr. of economic sciences, professor
Tripolskaya T. A., Dr. philologist sciences, professor
Isakova N. V., Dr. of philosophical sciences, professor

Advisory Board

Gerasyov A. D., Dr. of biological sciences, professor
Abaskalova N. P., Dr. of pedagogical sciences, professor
Aizman O., Ph.D., M.D. (Stockholm, Sweden)
Aftanas L. I., Dr. of medical sc., prof., acad. of RAMS
Barahtenova L. A., Dr. of biological sciences, professor
Bezrukih M.M., Dr. of boil.sc., prof., acad. of RAE(Moscow)
Bonola Anna, professor of slavistics (Milan, Italy)
Wingo Charles S., M. D., professor (Gainesville, USA)
Vinokurov Yu. I., Dr. of geogr. sciences, professor (Barnaul)
Galazhinsky E.V., Dr. of ps.sc., prof., acad. of RAE(Tomsk)
Gianni Celsi, Ph.D., professor (Uppsala, Sweden)
Ivanova L. N., Dr. of medical sc., prof., acad. of RAS
Zhafyarov A.Z., Dr. of phys.math.sc., corr-member of RAE
Zhukotskaya Z. R., Dr. of cultural, prof., (Nizhnevartovsk)
Kazin E. M., Dr. of biol.sc., acad. of IASHS (Kemerovo)
Logunov D., Ph.D., researcher (Manchester, Great Britain)
Medvedev M. A., Dr. of med. sc., acad. of RAMS (Tomsk)
Mukataeva Z.M., Dr. of boil. sc. (Pavlodar, Kazakhstan)
Ovchinnikov Yu. E., Dr. of phys. and math. sc., professor
Panin L. E., Dr. of med. sc., prof., acad. RAMS
Pecherskaya T. I., Dr. of philological sciences, professor
Puzirev V. P., Dr. of med.sc., prof., acad. RAMS (Tomsk)
Saharov A. V., Dr. of biological sciences, professor
Chagin A., Dr. of philos. sc., researcher (Stockholm, Sweden)
Shoshenko K. A., Dr. of med. sciences, professor

The registration certificate

The electronic journal «Novosibirsk State Pedagogical University Bulletin» is registered in Federal service on legislation observance in sphere of communication, information technologies and mass communications

The registration certificate ЭЛ № ФС77-50014

The journal leaves 6 times a year

The academic journal is established in 2011

Editorial publishing department:

630126, Novosibirsk, Vilyuiskaya, 28, r. 22
tel. 8 (383) 244-34-50

E-mail: vestnik@nspu.ru

СОДЕРЖАНИЕ**БИОЛОГИЧЕСКИЕ, ХИМИЧЕСКИЕ, МЕДИЦИНСКИЕ НАУКИ**

<i>Ягунов С.Е., Хольшин С.В., Кандалинцева Н.В.</i> (Новосибирск, Россия). Алкилпирокатехины: подходы к синтезу и антирадикальные свойства	5
<i>Богатыренко Т.Н., Коновалова Н.П., Сипягин А.М., Богатыренко В.Р., Куроптева З.В., Байдер Л.М., Сашенкова Т.Е., Федоров Б.С.</i> (Черноголовка, Москва, Россия). Повышение эффективности противоопухолевой химиотерапии цитостатиками с помощью гибридного нестероидного противовоспалительного соединения – азотнокислой соли диклофенакгидроксамовой кислоты.....	13
<i>Бурлака Ю.Б., Гринь Н.В., Верева С.В.</i> (Киев, Украина). Аминокислотный пул плазмы крови больных раком гортани.....	23
<i>Давыдовский А.Г.</i> (Минск, Беларусь). Системный анализ эффективности применения композиций антиоксидантов в малых дозах для коррекции окислительного стресса при токсико-септических состояниях.....	32
<i>Жусупова Г.Е., Шалахметова Т.М., Мурзахметова М.К., Гадецкая А.В., Жусупова А.И.</i> (Алматы, Казахстан). Антиоксидантная активность некоторых препаратов, полученных на основе растений Казахстана.....	43
<i>Ибрагимов У.К.</i> (Ташкент, Узбекистан). Сравнительный анализ эффекта антиоксиданта и антиоксиданта при лечении экспериментального инсульта.....	66
<i>Колесников А.В., Баренина О.И., Щулькин А.В.</i> (Рязань, Россия). Активность перекисного окисления липидов и состояние антиоксидантной системы хрусталика при экспериментальной катаракте на фоне местного применения антиоксидантов	70
<i>Кучменко Е.Б.</i> (Киев, Украина). Биохимические особенности функционирования убихинона при экспериментальных патологических состояниях сердечно-сосудистой системы.....	79
<i>Муротов О. У., Ибрагимов У.К.</i> (Ташкент, Узбекистан). Лечение антиоксидантом экспериментального инсульта: морфологические изменения в тканях головного мозга.....	95
<i>Панин Л.Е., Мокрушиников П. В.</i> (Новосибирск, Россия). Взаимодействие синтетических производных витамина Е на реологические свойства эритроцитарных мембран.....	101
<i>Петросян Т. Р., Геворгян О.В.</i> (Ереван, Армения). Влияние бактериального меланина на посттравматическое восстановление проводимости в моторном тракте у крыс.....	111
<i>Рузиев А.Ш., Муротов О.У., Ибрагимов У.К.</i> (Ташкент, Узбекистан). Антиоксидантная система субклеточных фракций печени при экспериментальном инсульте.....	122
<i>Русских И.В., Писарева С.И., Рябова Н.В.</i> (Томск, Россия). Спектральное проявление взаимодействия гидроксильных групп фенолов-антиоксидантов с растворителями.....	128
<i>Шосталь О.А., Москалев А.А.</i> (Сыктывкар, Россия). Влияние различных условий освещения на продолжительность жизни лабораторных линий <i>drosophilamelanogaster</i> с мутациями в генах супероксиддисмутазы.....	136
<i>Шубенкова Е.Г., Чжу О.П., Лобова Ю.Ю., Лутаева И.А.</i> (Омск, Россия). Исследование влияния условий экстракции на извлечение биологически активных веществ с антиоксидантными свойствами.....	144

Уважаемые читатели!

В журнале «Вестник Новосибирского государственного педагогического университета» (выпуск № 5 (15) 2013 г.) публикуются статьи, созданные по результатам работы Международной научно-практической конференции «Свободные радикалы и антиоксиданты в химии, биологии и медицине», которая проводилась совместно с Конференцией молодых учёных и VI школой «Окисление, окислительный стресс, антиоксиданты» им. академика Н. М. Эмануэля 1-4 октября 2013 г. в Новосибирском государственном педагогическом университете.

Проведение конференций в Новосибирске было приурочено к 10-летию НИИ химии антиоксидантов Новосибирского государственного педагогического университета и поддержано Программой стратегического развития ФГБОУ ВПО «НГПУ» на 2012-2016 гг.

Тематика конференции – фундаментальные и прикладные проблемы химии, химической технологии, биологии и медицины, связанные с изучением свободных радикалов, активированных кислородных метаболитов и антиоксидантов. Основная цель конференции – анализ достижений, проблем и перспектив фундаментальных и прикладных работ по прооксидантам и антиоксидантам, определение приоритетных направлений дальнейших исследований в этой области.

В программу конференции были включены пленарные, устные и стендовые доклады, а также круглые столы по проблемам тестирования и классификации антиоксидантов и по проблемам использования антиоксидантов при окислительном стрессе и свободнорадикальных патологиях.

Организаторы конференции: Министерство образования и науки Российской Федерации, Российская академия наук, Сибирское отделение Российской академии наук, Новосибирский государственный педагогический университет, Институт химической физики им. Н. Н. Семенова РАН (Москва), Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН (Москва), Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН, Некоммерческое партнёрство «Новосибирский институт антиоксидантов».

Оргкомитет конференции: Сопредседатели: Герасёв А.Д., д-р биол. наук, проф. (Россия, Новосибирск); Варфоломеев С.Д. д-р хим. наук, чл.-кор. РАН (Россия, Москва); Просенко А.Е., д-р хим. наук, проф. (Россия, Новосибирск); **Члены Оргкомитета:** Алтыникова Н.В., канд. пед. наук (Россия, Новосибирск); Багрянская Е.Г., д-р физ.-мат. наук, проф. (Россия, Новосибирск); Бурлакова Е.Б., д-р хим. наук, проф. (Россия, Москва); Ворожцов Г.Н., д-р хим. наук, чл.-кор. РАН (Россия, Москва); Григорьев И.А., д-р хим. наук, проф. (Россия, Новосибирск); Загулова Д.В., д-р мед. наук (Латвия, Рига); Кандалинцева Н.В., канд. хим. наук, доц. (Россия, Новосибирск); Касаикина О.Т., д-р хим. наук, проф. (Россия, Москва); Ланкин В.З., д-р биол. наук, проф. (Россия, Москва); Мартинович Г.Г., канд. биол. наук, доц. (Беларусь, Минск); Меньщикова Е.Б., д-р мед. наук (Россия, Новосибирск); Панин Л.Е., акад. РАМН (Россия, Новосибирск); Сахаров А.В., д-р биол. наук, проф. (Россия, Новосибирск); Сорокина И.В., д-р биол. наук, проф. (Россия, Новосибирск); Сторожок Н.М., д-р хим. наук, проф. (Россия, Тюмень); Тихазе А.К., д-р биол. наук, проф. (Россия, Москва); Толстикова Т.Г., д-р биол. наук, проф. (Россия, Новосибирск); Флейшман М.Ю., д-р мед. наук (Россия, Владивосток); Черенкевич С.Н., акад. НАН Беларуси, проф. (Беларусь, Минск); Hoppe G., Ph. D. (USA, Cleveland); Shabalina I., Ph. D. (Sweden, Stockholm); Tkachev V., Ph. D. (USA, Ann Arbor).

Ответственные редакторы выпуска журнала:

директор института естественных и
социально-экономических наук
доцент кафедры химии
старший преподаватель кафедры химии

Кандалинцева Наталья Валерьевна
Пинко Павел Иосифович
Ягунов Семен Евгеньевич

© С. Е. Ягунов, С. В. Хольшин, Н. В. Кандалинцева

УДК 547.56 + 542.943

АЛКИЛПИРОКАТЕХИНЫ: ПОДХОДЫ К СИНТЕЗУ И АНТИРАДИКАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА

С. Е. Ягунов, С. В. Хольшин, Н. В. Кандалинцева (Новосибирск, Россия)

В настоящее время в литературе отсутствуют надежные данные о зависимости антиоксидантных свойств от строения в рядах многоатомных фенолов. В данной работе авторами с использованием различных подходов осуществлен синтез структурно-связанного ряда алкилированных производных пирокатехина. Проведена оценка антирадикальных свойств синтезированных 4-алкил- и 3,5-диалкилпирокатехинов в модельной реакции AIBN-инициированного окисления стирола при 50°C. Полученные данные с одной стороны имеют фундаментальное значение, а с другой, представляют интерес для разработки новых ингибиторов окисления.

Ключевые слова: фенольные антиоксиданты, алкилпирокатехины, антиоксидантная активность.

Среди различных направлений исследований в области синтетических фенольных антиоксидантов наибольшее распространение получили работы, связанные с синтезом и изучением активности пространственно затрудненных одноатомных фенолов. В простых модельных системах противоокислительные свойства

таких соединений различной структуры исследованы достаточно подробно, и многие исследователи полагают, что эффективность лучших из известных антиоксидантов данного класса близка к теоретическому пределу и продолжение поиска новых более эффективных ингибиторов в пределах данного класса соединений является малоперспективным.

* Статья подготовлена по результатам работы Международной научно-практической конференции «Свободные радикалы и антиоксиданты в химии, биологии и медицине» (1-4 октября 2013 г.) в рамках реализации Программы стратегического развития ФГБОУ ВПО «Новосибирский государственный педагогический университет» на 2012–2016 гг.

Ягунов Семен Евгеньевич – старший преподаватель, кафедра химии института естественных и социально-экономических наук, Новосибирский государственный педагогический университет.

E-mail: syagunov@yandex.ru

Хольшин Сергей Викторович – аспирант кафедры химии института естественных и социально-экономических наук, Новосибирский государственный педагогический университет.

E-mail: s.kholshin@gmail.com

Кандалинцева Наталья Валерьевна – кандидат химических наук, доцент, директор института естественных и социально-экономических наук, Новосибирский государственный педагогический университет.

E-mail: aquaphenol@mail.ru

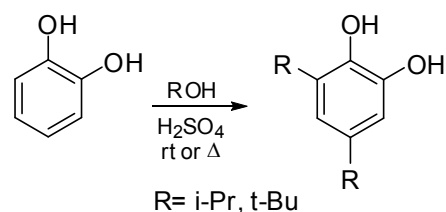
В этой связи несомненный интерес представляют немногочисленные работы, посвященные производным других ароматических спиртов, в частности пирокатехина [1].

Наличие двух фенольных ОН-групп в соседних положениях в структуре пирокатехинового фрагмента приводит к образованию внутримолекулярной водородной связи, за счет которой происходит ослабление одной из связей О-Н, что приводит к резкому увеличению константы скорости взаимодействия с пероксидными радикалами в сравнении фенолом и другими двухатомными ароматическими спиртами. Было показано, что данное преимущество сохраняется для ди-*трет*-бутилзамещенных пирокатехинов: так, 3,5- и 3,6-ди-*трет*-бутилпирокатехины по константе скорости взаимодействия с пероксидными радикалами значительно превосходят ди-*трет*-бутилзамещенные фенолы и приближаются к токоферолам [2]. Пирокатехины также способны к образованию хелатных комплексов с катионами металлов переменной валентности. Другой особенностью пирокатехинов является низкая устойчивость *орто*-хиноны, образующиеся при их окислении, что обуславливает высокую активность последних в отношении алкильных радикалов, а также – дополнительную возможность регенерации активных фенольных ОН-групп по реакциям образования полиядерных полифенолов. Как следствие, пирокатехины обычно характеризуются более высокими коэффициентами ингибирования ($f = 3-4$), нежели алкилзамещенные одноатомные фенолы ($f \leq 2$) [3].

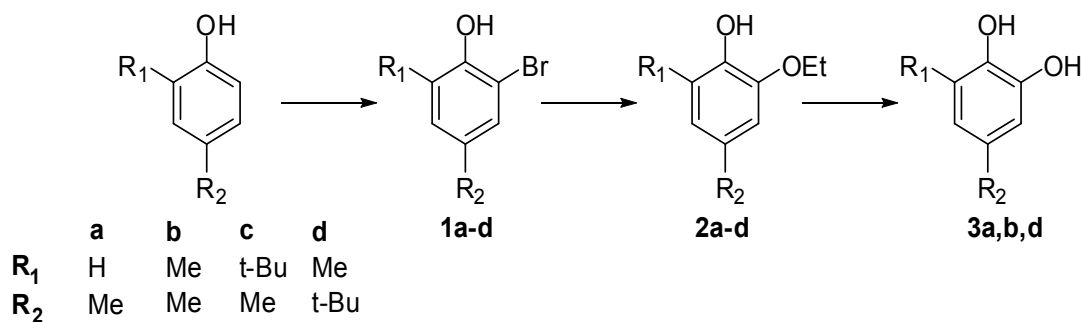
Таким образом, алкилпирокатехины являются перспективным объектом для

разработки на их основе новых антиоксидантных препаратов. Однако, данный класс соединений не является доступным сырьем – особенности строения пирокатехина делают классические способы получения пространственно-затрудненных фенолов мало приемлемы для получения алкилпирокатехинов. В этой связи в настоящей работе реализованы различные подходы синтеза алкилпирокатехинов, с целью получения структурно-связанного ряда производных и изучения закономерностей изменения антиоксидантных свойств.

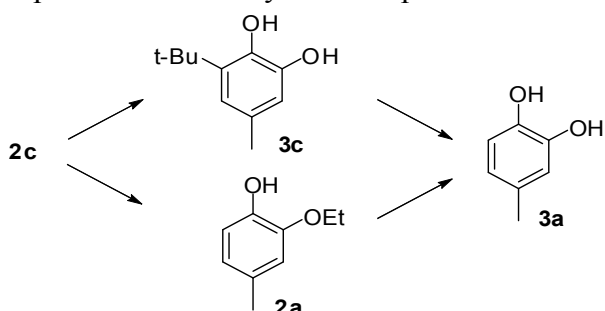
Алкилированием пирокатехина с высокими выходами удается получать лишь 3,5-ди-*трет*-бутил- и 3,5-диизопропилпирокатехины. В качестве алкилирующих агентов используются спирты в присутствии конц. H_2SO_4 . С третичными спиртами реакция протекает при комнатной температуре, вторичные спирты реагируют в более жестких условиях [4].



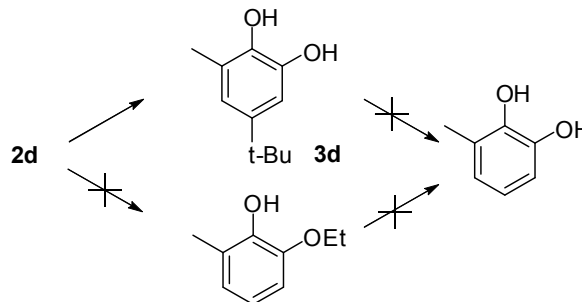
Использование данной стратегии для синтеза производных с меньшими алкильными заместителями или различными заместителями в положениях 3,5 не возможно. В этой связи для получения таких производных нами была реализована многостадийная схема синтеза предполагающая получение алкилпирокатехинов на основе соответствующим образом алкилированных фенолов введением дополнительной ОН-группы. Целевые соединения получали через промежуточный синтез 2-бром- и 2-этоксифенолов.



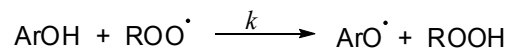
Бромфенолы **1a-d** с высокими выходами получали взаимодействием соответствующих фенолов с бромом при комнатной температуре в среде CCl₄. Взаимодействием бромфенолов **1a-d** с этилатом натрия по Ульману с высокими выходами были получены соединения **3a-c**. Данное превращение проводили в среде EtOH с добавками DMF и TMEDA для увеличения растворимости соединений CuI, что позволило смягчить условия реакции и увеличить селективность ее протекания [5]. Производные **2a-d** получены с выходами 93–99 %. Превращение 2-этоксифенолов в соответствующие пирокатехины осуществляли кипячением в конц. HBr. Стоит отметить, что этоксифенол **2c** в используемых условиях наряду с О-деалкилированием подвергался де-трет-бутированию. Согласно данным ГЖХ скорости С- и О-деалкилирования близки и промежуточные продукты присутствуют в системе в сопоставимых концентрациях, в системе накапливается продукт С- и О-деалкилирования – пирокатехин **3a**, таким образом данный путь неприемлем для получения пирокатехина **3c**.



В свою очередь изомерный этоксифенол **2d** в аналогичных условиях не подвергался де-трет-бутированию и с высоким выходом давал целевой 3-метил-5-трет-бутилпирокатехин **3d**.



Таким образом нами был осуществлен синтез структурно связанного ряда алкилпирокатехинов. Изучение антирадикальных свойств синтезированных соединений проводили в модельной реакции AIBN-инициированного окисления стирола при 50°C. В качестве реперного антиоксиданта был использован α-токоферол. Антирадикальную активность исследованных соединений характеризовали по величинам констант скоростей их взаимодействия с полипероксидными радикалами стирола (*k*).



Начальные участки кинетических кривых поглощения кислорода в условиях инициированного AIBN окисления стирола в присутствии исследуемых веществ хорошо спрямлялись в координатах уравнения

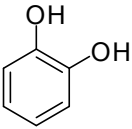
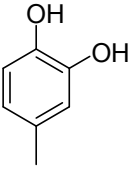
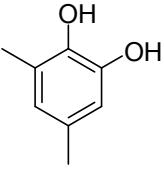
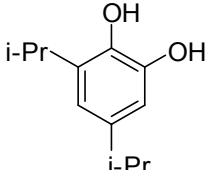
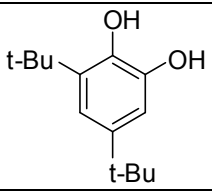
$$\frac{\Delta[\text{O}_2]}{[\text{RH}]} = -\frac{k_1}{k} \ln \left(1 - \frac{t}{\tau} \right) \quad (1)$$

где $\Delta[\text{O}_2]$ – количество поглощенного кислорода, отнесенное к объему пробы; $[\text{RH}]$ – концентрация окисляемого субстрата в пробе; k и k_1 – константы скорости реакции пероксидных радикалов с молекулами ингибитора и окисляемого субстрата соответственно; τ – период индукции; t – время.

По тангенсам углов наклона прямых в координатах $\Delta[\text{O}_2] / [\text{RH}]$ от $-\ln(1-t/\tau)$ находили отношение k_1/k . Абсолютные значения константы k вычисляли с использованием известного значения k_1 ($107.7 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ [6]). Найденные нами значения констант k (с доверительным интервалом) приведены в таблице 1.

Таблица 1.

Значения констант скорости k взаимодействия ингибиторов с полипероксидными радикалами стирола при 50°C и число цепей обрываемых на одной молекуле ингибитора f .

Структура	$k \cdot 10^{-6} / \text{л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$	f
	0.5 ± 0.1	2.08
	0.6 ± 0.1	2.10
	1.6 ± 0.3	2.05
	1.3 ± 0.2	2.12
	2.2 ± 0.3	2.10
α -токоферол	3.0 ± 0.5	2.00

Установлено, что пирокатехины не имеющие алкильного заместителя в положении 3 в 2,5–3 раза уступают 3,5-диалкилпирокатехинам по величине константы k . Диметил- и диизопропилпирокатехины

характеризовались близкими значениями константы k , в то время как для 3,5-ди-*трет*-бутилпирокатехина константа k принимала более высокие значения. Данная зависимость коренным образом отличается от закономерностей наблюдаемых для 2,6-

диалкилфенолов, где наибольшими значениями k характеризуются производные 2,6-диметилфенола. Так, для 2,4,6-триметилфенола величина k практически на порядок выше чем для ионола.

Таким образом, в рамках данной работы были предложены и успешно апробированы пути синтеза алкилированных производных пирокатехина на основе доступных алкилфенолов и пирокатехина. Определены кинетические параметры ингибирования AIBN-инициированного окисления стирола синтезированными соединениями. Выявлены предварительные данные о зависимости антирадикальной активности алкилпирокатехинов от структуры.

Экспериментальная часть

В работе были использованы коммерчески доступные реагенты и растворители (ABCR, Merck, Sigma-Aldrich, Reanal, Реахим). Растворители перед использованием очищали по стандартным методикам. 3,5-Ди-*трет*-бутилпирокатехин и 3,5-диизопропилпирокатехин получали по методикам описанным в работе [4].

Спектры ЯМР ^1H записаны на приборе «Bruker AV-600», с рабочей частотой 600 МГц, растворитель CDCl_3 , стандарт CHCl_3 (δ 7.24 м.д.). ГХЖ анализ проводили на хроматографе Agilent 7820A, колонка – HP-5, 30 м x 0.32 мм, газ-носитель – азот. ВЭЖХ анализ проводили на приборе Agilent Infinity 1220, колонка – ZORBAX SB-C18, 5мкм, 4.6 мм x 150 мм. ТСХ осуществляли на пластинках Silufol (UV 254). Температуры плавления определяли в капилляре на приборе ПТП (ПО «Химлаборприбор», Россия).

В кинетических исследованиях использовали коммерческий α -токоферол («Acros Organics»). Величины k определяли в

модельной реакции иницированного AIBN окисления стирола при 50°C. Стирол перед применением очищали двукратной вакуумной перегонкой.

Кинетику поглощения кислорода изучали с использованием высокочувствительного капиллярного волнометра. Период индукции (τ) определяли как точку пересечения двух касательных проведенных к кинетической кривой, тангенсы углов наклона которых составляют 0.5 и 0.75 от тангенса угла наклона прямой неингибированной реакции.

Скорость иницирования (W_i) определяли методом ингибиторов по времени окончания периода индукции окисления стирола в присутствии α -токоферола

$$W_i = 2[\text{ArOH}]_0 / \tau$$

где $[\text{ArOH}]_0$ – начальная концентрация ингибитора.

Эксперименты по окислению стирола проводили при $W_i = (1.9\text{--}2.1) \cdot 10^{-7} \text{ М} \cdot \text{с}^{-1}$ и $[\text{ArOH}] = (1.2\text{--}1.8) \cdot 10^{-4} \text{ М}$.

2-Бром-4-метилфенол (1a). К раствору *пара*-крезола (50 г, 462.36 ммоль) в 150 мл CCl_4 при перемешивании по каплям прибавляли раствор брома (77.59 г, 485.48 ммоль) в 100 мл CCl_4 (весь объем за 4 часа). Затем смесь выдержали при комнатной температуре 1 час, прибавили 100 мл 10%-ного водного раствора Na_2SO_3 . Органический слой отделили, водную фазу обработали хлороформом (2x50 мл), органические фазы объединили, промыли водой, высушили над Na_2SO_4 , растворитель отогнали, остаток 87.85 г (содержание основного вещества (СОВ) 86% по ГЖХ), перегнали в вакууме, получили 73.38 г (85%) продукта, т.кип. = 51–55°C (1 Торр). Найдено (%): С, 44.63; Н, 3.89; $\text{C}_7\text{H}_7\text{BrO}$; Вычислено (%): С, 44.95; Н, 3.77. Спектр ЯМР ^1H (δ , м.д., $\text{J}/\text{Гц}$): 2.27 с (3 H, ArCH_3); 5.24 с (1 H, ArOH); 6.86 д (1 H, ArH ,

$J=7.8$); 6.96 дд (1 H, ArH, $J=8.4$, $J=1.8$); 7.22 д (1 H, ArH).

Аналогично **1a** получали соединения **1b-d**.

2-Бром-4,6-диметилфенол (1b). Выход 93%, т.кип. = 60-65°C (1 Торр). Найдено (%): C, 47.51; H, 4.40; C_8H_9BrO ; Вычислено (%): C, 47.79; H, 4.51. Спектр ЯМР 1H (δ , м.д., $J/Гц$): 2.30 с (3 H, ArCH₃); 2.60 с (3 H, ArCH₃); 5.40 с (1 H, ArOH); 6.86 д (1 H, ArH); 7.10 с (1 H, ArH).

2-Бром-4-метил-6-трет-бутилфенол (1c). Выход 92%, т.кип. = 80-83°C (1 Торр). Найдено (%): C, 54.20; H, 6.05; $C_{11}H_{15}BrO$; Вычислено (%): C, 54.34; H, 6.22. Спектр ЯМР 1H (δ , м.д., $J/Гц$): 1.39 с (9 H, Ar-*t*-Bu); 2.27 с (3 H, ArCH₃); 5.58 с (1 H, ArOH); 6.95 д (1 H, ArH); 7.11 д (1 H, ArH).

2-Бром-4-трет-бутил-6-метилфенол (1d). Выход 96%, т.пл. = 45-47°C, т.кип. = 88-92°C (1 Торр). Найдено (%): C, 54.52; H, 6.03; $C_{11}H_{15}BrO$; Вычислено (%): C, 54.34; H, 6.22. Спектр ЯМР 1H (δ , м.д., $J/Гц$): 1.28 с (9 H, Ar-*t*-Bu); 2.27 с (3 H, ArCH₃); 5.29 с (1 H, ArOH); 7.00 д (1 H, ArH); 7.20 д (1 H, ArH).

2-Этокс-4-метилфенол (2a). В 340 мл EtOH растворили Na (25.76 г, 1.12 моля), затем прибавили раствор **1a** (52.37 г, 0.28 моля), CuI (11.20 г, 58.80 ммоль) и TMEDA (11.39 г, 98.00 ммоль) в 85 мл DMF. Смесь перемешивали 3.5 ч при 80 °C. Затем охладили, прибавили 1120 мл 2 M раствора NH_4Cl , обработали толуолом (3x200 мл), органическую фазу промыли 2 M раствором NH_4Cl , насыщенным раствором NaCl, высушили Na_2SO_4 , растворитель отогнали. Остаток (41.95 г, СОВ 98% по ГЖХ) перегнали в вакууме, получили 36.36 г (85%) продукта в виде смолы, кристаллизующейся при охлаждении, т.пл. = 30-32°C, т.кип. = 72-80°C (1 Торр). Найдено (%): C, 71.28; H, 8.14; $C_9H_{12}O_2$; Вычислено (%): C, 71.03; H, 7.95.

Спектр ЯМР 1H (δ , м.д., $J/Гц$): 1.45 т (3 H, OCH_2CH_3 , $J=7.2$); 2.26 с (3 H, ArCH₃); 4.07 к (2 H, OCH_2CH_3 , $J=6.6$); 5.30 с (1 H, ArOH); 6.58 м (2 H, ArH); 6.72 д (1 H, ArH, $J=7.8$).

Аналогично **2a** получали соединения **2b-d**.

2-Этокс-4,6-диметилфенол (2b). Выход 90%, т.пл. = 53-55°C, т.кип. = 67-75°C (1 Торр). Найдено (%): C, 71.29; H, 8.13; $C_9H_{12}O_2$; Вычислено (%): C, 71.03; H, 7.95. Спектр ЯМР 1H (δ , м.д., $J/Гц$): 1.46 т (3 H, OCH_2CH_3 , $J=7.2$); 2.19 с (3 H, ArCH₃); 2.23 с (3 H, ArCH₃); 4.06 к (2 H, OCH_2CH_3 , $J=6.6$); 5.37 с (1 H, ArOH); 6.42 д (1 H, ArH, $J=8.4$); 6.46 д (1 H, ArH).

2-Этокс-4-метил-6-трет-бутилфенол (2c). Выход 88%, т.пл. = 45-47°C. Найдено (%): C, 74.80; H, 9.75; $C_{13}H_{20}O_2$; Вычислено (%): C, 74.96; H, 9.68. Спектр ЯМР 1H (δ , м.д., $J/Гц$): 1.37 с (9 H, Ar-*t*-Bu); 1.46 т (3 H, OCH_2CH_3 , $J=7.2$); 2.24 с (3 H, ArCH₃); 4.07 к (2 H, OCH_2CH_3 , $J=7.2$); 5.73 с (1 H, ArOH); 6.46 д (1 H, ArH); 6.57 д (1 H, ArH).

2-Этокс-4-трет-бутил-6-метилфенол (2d). Выход 96%, т.кип. = 85-95°C (1 Торр). Найдено (%): C, 75.10; H, 9.43; $C_{13}H_{20}O_2$; Вычислено (%): C, 74.96; H, 9.68. Спектр ЯМР 1H (δ , м.д., $J/Гц$): 1.26 с (9 H, Ar-*t*-Bu); 1.45 т (3 H, OCH_2CH_3 , $J=7.2$); 2.21 с (3 H, ArCH₃); 4.09 к (2 H, OCH_2CH_3 , $J=7.2$); 5.38 с (1 H, ArOH); 6.63 м (2 H, ArH).

4-Метилпирокатехин (3a). **2a** (3.04 г, 20.00 ммоль) кипятили с 12 мл 46 % раствора HBr (0.1 моля) 8 часов. Реакционную массу охладили, обработали толуолом (3x20 мл), органическую фазу промыли насыщенным раствором NaCl, высушили Na_2SO_4 , растворитель отогнали, остаток перекристаллизовали из толуола, получили 1.79 г (72%) продукта с т.пл. = 67-69°C. Найдено (%): C, 67.45; H, 6.59, $C_7H_8O_2$; Вычислено (%): C, 67.73; H, 6.50. Спектр

ЯМР ^1H (δ , м.д., $J/\text{Гц}$): 2.19 с (3 H, ArCH_3); 5.2 уш с (2 H, ArOH); 6.50 дд (1 H, ArH , $J=7.2$, $J=1.8$); 6.60 д (1 H, ArH , $J=1.8$); 6.66 д (1 H, ArH , $J=7.2$).

Аналогично **3a** получали соединения **3b,d**.

3,5-Диметилпирокатехин (3b). Выход 74%, т.пл. = 67.5-69°C (ср.лит. [7]: 69.5-71°C). Найдено (%): C, 69.36; H, 7.45, $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_2$; Вычислено (%): C, 69.54; H, 7.30. Спектр ЯМР ^1H (δ , м.д., $J/\text{Гц}$): 2.19 с (6 H, ArCH_3); 5.09 уш с (2 H, ArOH); 6.43 д (2 H, ArH).

3-Метил-5-трет-бутилпирокатехин (3d). Выход 73%, т.пл. = 113-115°C. Найдено (%): C, 73.46; H, 8.80, $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_2$; Вычислено

(%): C, 73.30; H, 8.95. Спектр ЯМР ^1H (δ , м.д., $J/\text{Гц}$): 1.24 с (9 H, $\text{Ar-}t\text{-Bu}$); 2.22 с (3 H, ArCH_3); 4.88 с (1 H, ArOH); 5.01 с (1 H, ArOH); 6.62 д (1 H, ArH); 6.64 д (1 H, ArH).

Взаимодействие 2-этоксифенола с HBr. Этоксифенол **2c** (4.17 г, 20.00 ммоль) кипятили с 12 мл 46% раствора HBr (0.1 моля) 10 часов. Реакционную массу охладили, обработали серным эфиром (3x20 мл), органическую фазу промыли насыщенным раствором NaCl, высушили Na_2SO_4 , растворитель отогнали, остаток перекристаллизовали из толуола, получили 1.16 г (70%) **3a**.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Меньщикова Е. Б., Ланкин В. З., Кандалинцева Н. В.** Фенольные антиоксиданты в биологии и медицине. – LAMBERT, 2012.
2. Окисление, окислительный стресс, антиоксиданты: Всероссийская конференция молодых ученых и школа им. академика Н.М. Эммануэля. Доклады и тезисы. – М.: Изд-во РУДН, 2006. – С.146–147.
3. **Азатян Н. А., Карпухина Г. В., Белостоцкая И. С., Комиссарова Н. Л.** Механизм ингибирования процессов окисления двухатомными фенолами // Нефтехимия. – 1973. – № 3. – С. 435–440.
4. **Масловская Л. А., Петрикевич Д. К., Тимошук В. А., Шадыро О. И.** Синтез и антиокислительные свойства некоторых производных алкилированного пирокатехина // Журнал общей химии. – 1996. – № 11. – С. 1893–1898.
5. **Yagunov S. E., Kandalintseva N. V., Prosenko A. E.** Copper-catalyzed coupling reaction in synthesis of new antioxidants / International Congress on Organic Chemistry. – Kazan, 2011. – September 18-23. – p 199.
6. **Поздеева Н. Н., Якущенко И. К., Александров А. Л., Денисов Е. Т.** Механизм тормозящего действия гидрохинона, краун-гидрохинона и его комплексов с солями лития и магния при окислении стирола // Кинетика и катализ. – Новосибирск, 1991. – № 6. – С. 1302–1309.
7. **Weller D. D., Stirchak E. P.** Quassinoid Synthesis via o-Quinone Diels-Alder Reactions // J. Org. Chem. – 1983. – Vol. 48. – N. 25. – pp. 4873–4879.

© S. E. Yagunov, S. V. Kholshin, N. V. Kandalintseva

UDC 547.56 + 542.943

ALKYLPYROCATECHOLS: SYNTHESIS AND ANTIRADICAL ACTIVITY*S. E. Yagunov, S. V. Kholshin, N. V. Kandalintseva (Novosibirsk, Russia)*

Data on the dependence of the antioxidant properties of the structure in the ranks of polyhydric phenols are poorly understood. This article focuses on the synthesis of structurally related series of alkylated catechol with using different approaches. Antiradical properties of synthesized 4-alkyl- and 3,5-dialkylcatechols were studied in the model reaction of AIBN-initiated oxidation of styrene at 50 °C. In this regard, the received data have fundamental importance, and also interest to the development of new inhibitors of oxidation.

Keywords: phenolic antioxidants, alkylpyrocatechols, antioxidant activity.

REFERENCES

1. **Menshchikova E. B., Lankin V. Z., Kandalintseva N. V.** Phenolic antioxidants in biology and medicine. – LAMBERT, 2012.
2. **Oxidation**, oxidative stress, antioxidants: All-Russian Conference of Young Scientists and School of Academician N.M. Emmanuel. Moscow: Publishing House of the Peoples' Friendship University, 2006. – P.146–147.
3. **Azatyany N. A., Karpuchina G. V., Belostockaya I. C., Komissarova N. L.** The mechanism of inhibition of the oxidation of dihydric phenols // Petrochemicals. – 1973. – № 3. – Pp.435–440.
4. **Maslovskaya L. A., Petrikevich D. K., Timoschuk V. A., Shadyro O. I.** Synthesis and antioxidant properties of some derivatives alkylated catechol // Russian Journal of General Chemistry. – 1996. – № 11. – Pp.1893–1898.
5. **Yagunov S. E., Kandalintseva N. V., Prosenko A. E.** Copper-catalyzed coupling reaction in synthesis of new antioxidants / International Congress on Organic Chemistry, 2011. – Kazan. – September 18–23. – p. 199.
6. **Pozdeeva N. N., Yakushenko I. K., Aleksandrov A. L., Denisov E. T.** The mechanism of the inhibitory effect of hydroquinone, hydroquinone–crown and its complexes with lithium and magnesium salts in the oxidation of styrene // Kinetics and Catalysis. 1991. – № 6. – Pp. 1302–1309.
7. **Weller D. D., Stirchak E. P.** Quassinoid Synthesis via o-Quinone Diels-Alder Reactions // J. Org. Chem. – 1983. – Vol. 48. – N 25. – Pp. 4873–4879.

Yagunov Semen Evgen'evich– Senior Lecturer, Department of Chemistry, Novosibirsk State Pedagogical University

E-mail: syagunov@yandex.ru

Kholshin Sergey Viktorovich – PhD–student, Department of Chemistry, Novosibirsk State Pedagogical University

E-mail: s.kholshin@gmail.com

Kandalintseva Natalia Valer'evna – PhD, Docent, Director of Institute of Natural and Socio–Economic Sciences, Novosibirsk State Pedagogical University

E-mail: aquaphenol@mail.ru

© Т. Н. Богатыренко, Н. П. Коновалова, А. М. Сипягин, Т. Е. Сашенкова,
Б. С. Федоров, В. Р. Богатыренко, З. В. Куроптева, Л. М. Байдер

УДК 616-085. 2/3

**ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ХИМИОТЕРАПИИ
ЦИТОСТАТИКАМИ С ПОМОЩЬЮ ГИБРИДНОГО НЕСТЕРОИДНОГО
ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО СОЕДИНЕНИЯ – АЗОТНОКИСЛОЙ СОЛИ
ДИКЛОФЕНАКГИДРОКСАМОВОЙ КИСЛОТЫ** Т. Н. Богатыренко, Н. П. Коновалова, А. М.

Сипягин, Т. Е. Сашенкова, Б. С. Федоров,
В. Р. Богатыренко (Черноголовка, Россия), З. В. Куроптева, Л. М. Байдер (Москва, Россия)

В статье исследуются возможности повышения противоопухолевого действия цитостатика циклофосфана (ЦФ). В комплексной терапии опухолевых заболеваний наряду с основными противоопухолевыми препаратами часто используют нестероидные противовоспалительные соединения (НСПВС) в качестве ингибиторов циклооксигеназ (COX-1 и COX-2), являющихся двумя изоформами фермента простагландин-Н синтазы (PGHS). Они вовлечены во все основные события канцерогенеза. Гем-содержащий фермент PGHS обладает двумя активностями: циклооксигеназной (COX) и пероксидазной (PO). Большинство НСПВС являются ингибиторами COX-активности и не влияют на PO-активность, вызывая при их длительном использовании побочные эффекты. В работе исследуется синтезированное в ИПХФ РАН гибридное НСПВС – азотнокислая соль диклофенакгидроксамовой кислоты (ДГК·HNO₃). Соединение сочетает в своей структуре типичный НСПВС – диклофенак (ингибитор COX-активности), гидроксаматную группировку, хелатирующую металлы (ингибитор PO-активности) и за счет солевой формы с азотной кислотой, являющееся донором оксида азота. Исходя из проведенных ранее экспериментов (7), была поставлена задача – исследовать влияние на противоопухолевую активность комбинации ЦФ с ДГК·HNO₃.

Было показано, что при использовании терапевтической дозы ЦФ хемосенсибилизирующий эффект комбинации ЦФ с ДГК·HNO₃ приводит к 100% излечиванию животных с лейкемией Р-388. Методом ЭПР исследованы изменения сигнала ЭПР активной формы цитохрома Р-450 в образцах печени после введения животным ДГК·HNO₃. Показано, что введение ДГК·HNO₃ приводит к образованию неактивных нитрозольных комплексов цитохрома Р-450-NO и снижению сигнала ЭПР цитохрома Р-450 в течение 5 часов после введения препарата. Появление комплексов Р-450-NO связывают с образующимся при восстановлении азотной кислоты оксидом азота. Высказывается предположение, что вызываемое образующимся оксидом азота пролонгированное ингибирование цитохрома Р-450 в первые часы после введения препарата ответственно за усиление химиотерапевтического действия ЦФ. В заключении делается вывод, что использование гибридного НСПВС, обладающего разными типами активности, может приводить к значительному усилению противоопухолевого действия цитостатиков, вплоть до 100% излечения животных.

Ключевые слова: циклофосфан, нестероидные противовоспалительные соединения, гидроксамовые кислоты, оксид азота, цитохром Р-450, лимфолейкоз Р-388, ЭПР-спектроскопия.

В последнее время в качестве важного звена в противоопухолевой терапии рассматривают ингибиторы циклооксигеназ (COX-1 и COX-2), являющихся двумя изоформами одного из ключевых ферментов метаболизма арахидоновой кислоты (АК) – простагландин-Н-синтазы (PGHS). Внимание к ингибиторам COX обусловлено вовлечением этих ферментов во все основные события канцерогенеза, начиная от метаболической активности химических канцерогенов, эффекта промоторов, экспрессии онкогенов, иммуносупрессии, до способности простанои-

дов влиять на пролиферацию, апоптоз, дифференцировку и метастазирование опухолевых клеток (1). Гем-содержащий фермент PGHS является скоростью лимитирующим ферментом при синтезе простагландинов, тромбоксанов, простациклинов. Он обладает двумя различными активностями: циклооксигеназной (COX) и пероксидазной (PO). COX-активность конвертирует АК в гидропероксид (простагландин G_2 -PGG₂). PO-активность восстанавливает PGG₂ в спирт PGH₂ в результате двухэлектронного переноса, осуществляемого с участием гема (2).

* Статья подготовлена по результатам работы Международной научно-практической конференции «Свободные радикалы и антиоксиданты в химии, биологии и медицине» (1-4 октября 2013 г.) в рамках реализации Программы стратегического развития ФГБОУ ВПО «Новосибирский государственный педагогический университет» на 2012–2016 гг.

Богатыренко Татьяна Николаевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной химиотерапии опухолей, Институт проблем химической физики РАН.

E-mail: btn@icp.ac.ru

Коновалова Нина Петровна – доктор биологических наук, заведующая лабораторией экспериментальной химиотерапии опухолей, Институт проблем химической физики РАН.

E-mail: ninap@icp.ac.ru

Сипягин Алексей Михайлович – старший научный сотрудник лаборатории биологически активных веществ, Институт проблем химической физики РАН.

E-mail: btn@icp.ac.ru

Богатыренко Виктор Родионович – кандидат химических наук, научный сотрудник лаборатории спектроскопии, Институт проблем химической физики РАН.

E-mail: bvr@icp.ac.ru

Куроптева Зоя Вениаминовна – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории спектроскопии, Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН.

E-mail: zvkh@sky.chph.ras.ru

Байдер Лариса Михайловна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории спектроскопии, Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН.

E-mail: bay42@mail.ru

Сашенкова Татьяна Евгеньевна – старший инженер лаборатории экспериментальной химиотерапии опухолей, Институт проблем химической физики РАН.

E-mail: btn@icp.ac.ru

Федоров Борис Сергеевич – доктор технических наук, заведующий лабораторией биологически активных веществ, Институт проблем химической физики РАН.

E-mail: boris-45@inbox.ru

Взаимосвязь между этими активностями представляет собой интерес в виду важности этого фермента в регуляции биосинтеза эйкозаноидов. Известно, что обе активности (COX и PO) расположены в различных, хотя и взаимодействующих сайтах на мембрансвязанной молекуле PGHS (3). Использование селективных ингибиторов для одной или обеих каталитических активностей PGHS способствует пониманию взаимосвязи между этими двумя активностями и созданию более совершенных лекарств. Большинство нестероидных противовоспалительных препаратов (аспирин, индометацин, ибупрофен) являются ингибиторами COX-активности. Они конкурируют с АК за связывание с ферментом PGHS. Ингибирование обеих изоформ COX НСПВС носит различный характер – от конкурентного, время зависимого до необратимо ковалентного. Последнее характерно для аспирина, обладающего уникальными особенностями среди всех известных НСПВС. Он необратимо ингибирует COX-1, ацетилируя сериновый остаток в субстратном канале и конвертирует COX-2 в 15-липоксигеназу, предотвращая тем самым генерацию простагландинов (4). В то же время эти препараты не влияют на PO-активность PGHS, вызывая при их длительном использовании побочный, так называемый, ulcerогенный эффект.

Известны два направления модификации НСПВС. Первое – это создание NO-донорных НСПВС. Это известные НСПВС, в боковую цепь которых введена группировка, содержащая нитратную функцию, вследствие чего они способны проявлять NO-донорную активность, которая нивелирует ulcerогенный эффект (5). Второе направление – это создание селективных ингибиторов COX -активностей.

Интересные подходы для создания подобного рода соединений были предложены в работе (6). Присоединение гидроксаматной группировки к известному ингибитору циклооксигеназной активности – напроксену превращало его в активный PO-ингибитор при сохранении циклооксигеназной активности.

Механизм многофакторного противоопухолевого действия НСПВС до конца не ясен. На сегодняшний день можно говорить о том, что сами по себе НСПВС не являются эффективными средствами для лечения онкологических заболеваний. Однако применение соединений этого типа в комплексном подходе к лечению онкологических заболеваний для оптимизации действия химиотерапевтических препаратов может привести к интересным результатам. В ИПХФ РАН было синтезировано гибридное НСПВС – диклофенакгидроксамовая кислота, солевая форма. Соединение сочетает в своей структуре типичный противовоспалительный агент – диклофенак (ингибитор COX-активности), гидроксаматную группировку, хелатирующую металлы (ингибитор PO-активности) и за счет солевой формы с азотной кислотой являющееся донором оксида азота.

Исходя из проведенных ранее экспериментов по усилению цитотоксического действия противоопухолевых препаратов при использовании гидроксамовых кислот и нитрата натрия (7,8) была поставлена задача – изучить влияние на противоопухолевую активность комбинации циклофосфана (ЦФ) с азотнокислой солью диклофенакгидроксамовой кислоты (ДГК · HNO₃).

Методика исследования.

Препараты. Был использован цитостатик циклофосфан (ЦФ, ОАО “Биохимик”). ЦФ применяли в субтерапевтической дозе – 60 мг/кг и

терапевтической дозе – 120 мг/кг. Вводили внутривентрикулярно, двукратно на 1-е и 6-е сутки после перевивки опухоли.

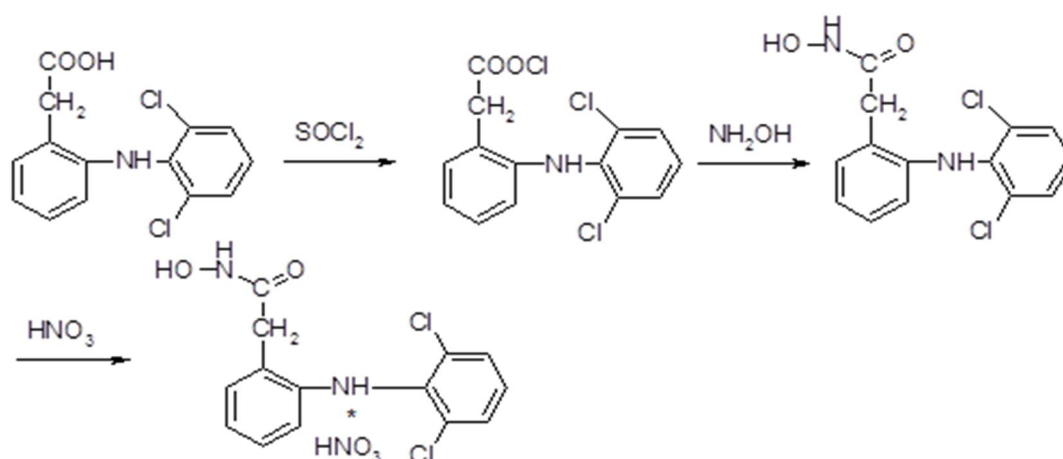
Для усиления противоопухолевой активности ЦФ было использовано гибридное НСПВС – азотнокислая соль диклофенакгидроксамовой кислоты ($\text{ДГК} \cdot \text{HNO}_3$), синтезированная ИПХФ РАН (рис. 1). Исследуемое соединение вводили внутривентрикулярно, 6-тикратно, в дозе 40 мг/кг. Режим введения и дозы были

выбраны исходя из ранее проведенных экспериментов. Экспериментально определенная доза токсичности $\text{ДГК} \cdot \text{HNO}_3$ превышала 1000 мг/кг. В таких случаях при дальнейших исследованиях противоопухолевой активности обычно берут дозу равную 1/3 или 1/4 от токсической, т.е. в нашем случае 300-400 мг/кг. Мы намеренно брали дозы и цитостатика и $\text{ДГК} \cdot \text{HNO}_3$ в 2-10 раз меньшие (т.е. субтоксические) 60–40 мг/кг соответственно.

Рисунок 1.

Получение азотнокислой соли оксиамида 2-[(2,6 – дихлорфенил) амино] бензолуксусной кислоты ($\text{ДГК} \cdot \text{HNO}_3$).

Вещество идентифицировано с помощью элементного анализа, ИК-спектра, спектра ПМР на приборе Bruker-200



Экспериментальные опухоли и животные. Содержание животных и исследования проводили в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей. Противоопухолевую активность изучали на лимфолейкозе мышей Р-388. Перевивку опухоли проводили внутривентрикулярно мышам-гибридам ВДФ1 по стандартной методике (9). Оценку эффективности исследуемых композиций

проводили также по стандартной методике (10). В качестве критериев эффективности терапии были использованы: индекс увеличения средней продолжительности жизни (ILS %) в сравнении со средней продолжительностью жизни нелеченых мышей-опухоленосителей (контроль) и в сравнении со средней продолжительностью жизни, леченных одним ЦФ (монотерапия), а также число излеченных животных (проживших 60 суток и более) и при

определении ILS продолжительность их жизни принималась равной 60 суткам.

Для исследования изменений метаболических парамагнитных центров в тканях животных под действием ДГК·HNO₃ использовали изолированную печень мышей линии BDF1. После декапитации животных выделяли печень, измельчали ее в физиологическом растворе, добавляли исследуемое соединение в концентрации 10⁻³М и инкубировали при комнатной температуре. Параллельно при тех же условиях инкубировали контрольные образцы тканей печени в физиологическом растворе без добавок препарата. Через определенные промежутки времени отбирали пробы и готовили образцы по стандартной методике. Спектры ЭПР приготовленных образцов измеряли на радиоспектрометре Х-диапазона ER-300D фирмы «Bruker» (Германия). Условия регистрации спектров: мощность СВЧ – излучения 20мВт, амплитуда модуляции магнитного поля 5 Гс, температура – 77К.

Результаты и обсуждение

На рис. 2 представлены результаты, полученные при лечении животных с лимфолейкозом Р-388 с использованием одного цитостатика ЦФ и его комбинации с ДГК·HNO₃. Как видно из представленных данных, при введении одного ЦФ в дозе 60 мг/кг средняя продолжительность жизни животных увеличивалась в 3 раза по сравнению с нелечеными контрольными животными, показатель ILS % составлял 190 %. Выживших животных не было (рис. 2, кривая 3). При увеличении дозы ЦФ до терапевтической – 120 мг/кг средняя продолжительность жизни увеличивалась в 4,5 раза, показатель ILS% составлял 350 % и появлялось 50 % излеченных животных

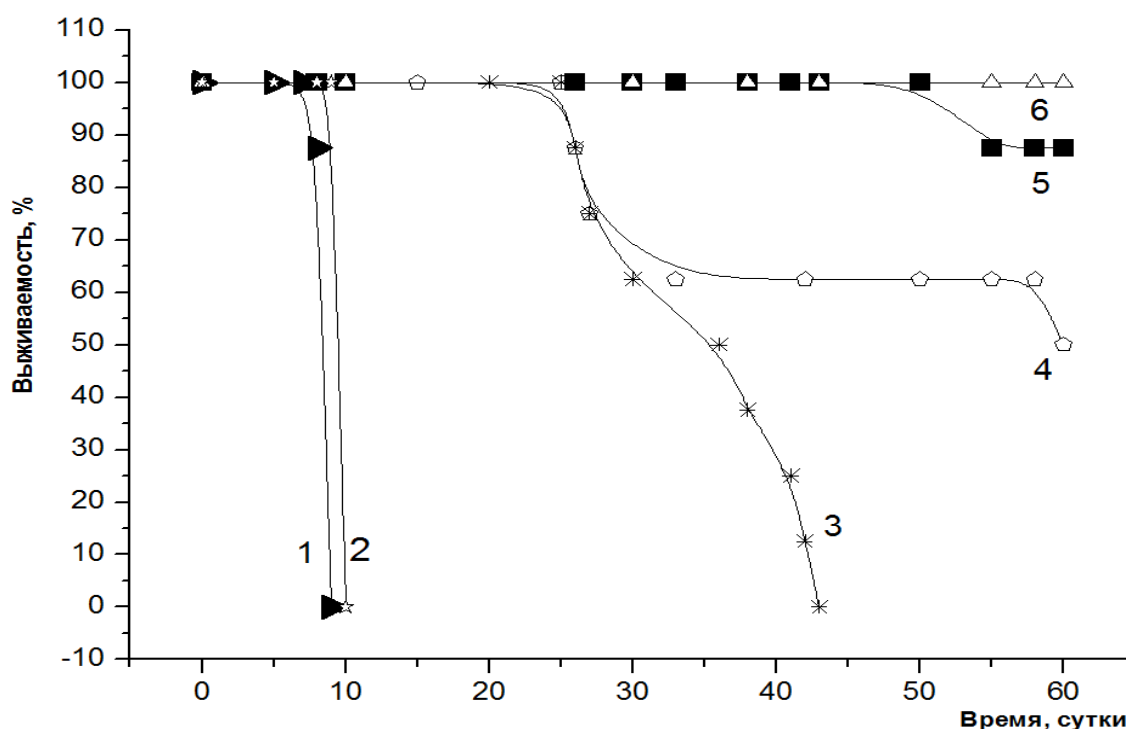
(рис. 2, кривая 4). ДГК·HNO₃ в исследуемой концентрации не обладала антилейкемической активностью (рис. 2, кривая 1). Все животные погибли одновременно с контролем. Хемосенсибилизирующий эффект комбинации ЦФ с ДГК·HNO₃ при дозе ЦФ 60 мг/кг увеличивал среднюю продолжительность жизни в 6 раз, показатель ILS % увеличивался до 480 % при излечивании 88 % животных (рис.2, кривая 5), а при дозе ЦФ 120 мг/кг наблюдалось 100 % излечение животных, при увеличении ILS % до 500 % (рис. 2, кривая 6).

Известно, что ЦФ подвергается первоначальной биотрансформации в печени под действием микросомальных оксигеназ. Гидроксилирование в системе эндоплазматического ретикулума происходит с участием оксигеназной системы цитохрома Р-450, в результате образуются активные метаболиты, которые, попадая в ткани, проявляют алкилирующее действие (11). Существует определенная селективность действия ЦФ на опухолевые ткани, что частично объясняется способностью печени защищаться от цитотоксичности индуцированной ЦФ, путем дальнейшей деградации активных промежуточных продуктов метаболизма ЦФ. Однако проблема цитотоксичности ЦФ остается острой. Одним из механизмов снятия токсичности при рациональной комплексной лекарственной терапии может стать NO-опосредованное угнетение метаболизма ЦФ. Для частичного ингибирования системы гидроксилирования и был использован оксид азота, образующийся при превращениях ДГК·HNO₃. Исследовались изменения метаболических парамагнитных центров в тканях печени и крови животных после введения ДГК·HNO₃ (рис.3).

Рисунок 2.

Усиление противоопухолевого действия циклофосфана (ЦФ) при сочетанном введении с ДГК·HNO₃ на мышах с лейкемией Р-388.

1. ДГК·HNO₃ (40 мг/кг);
2. Контроль;
3. ЦФ(60 мг/кг);
4. ЦФ(120 мг/кг);
5. ЦФ(60мг/кг) + ДГК·HNO₃ (40 мг/кг);
6. ЦФ(120 мг/кг) + ДГК·HNO₃ (40 мг/кг).



Было показано снижение сигнала ЭПР активной формы цитохрома Р-450 уже через 15 мин после введения ДГК·HNO₃ и образование неактивного комплекса цитохром Р-450-NO, появление которого обусловлено образующимся при восстановлении азотной кислоты оксидом азота. Динамика изменения сигналов цитохрома Р-450 в печени прослеживалась в течение 5-ти часов после введения препарата. Максимальное ингибирование сигнала цитохрома Р-450 наблюдалось через 2 часа после введения ДГК·HNO₃. Мы предпо-

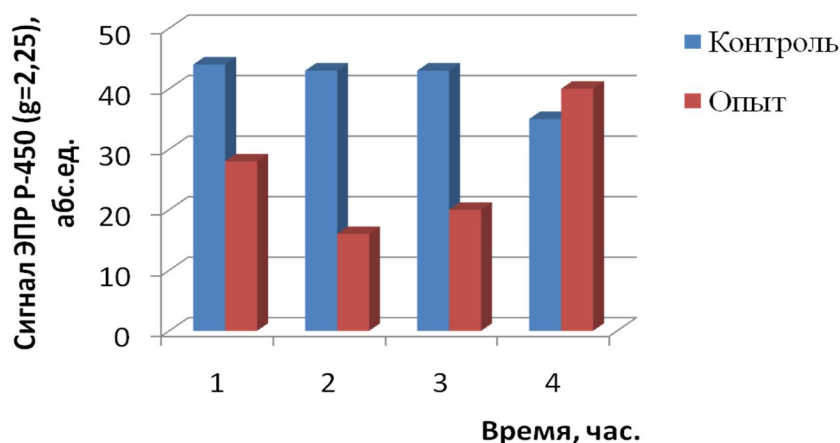
лагаем, что вызываемое образующимся оксидом азота пролонгированное ингибирование цитохрома Р-450 в первые часы после введения препарата, приводит к усилению химиотерапевтического действия ЦФ.

Таким образом, показана возможность повышения эффективности химиотерапии цитостатиками при использовании оригинальных гибридных НСПВС, обладающих разными типами активности, что позволяет получить 100% излечение животных.

Рисунок 3.

Динамика изменения интенсивности сигнала цитохрома P-450 в тканях печени животных под влиянием ДГК·HNO₃.

1. 0,5 час;
2. 2 час;
3. 5 час;
4. 24 час.



СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кудрявцев И. А., Мясищева Н. В. Циклооксигеназа-1 и -2 как мишени в химиотерапии и химиопрофилактике опухолей животных и человека.// Российский биотерапевтический журнал. – 2008. – Т. 7. – № 3. – С. 48–56.
2. Chubb A. J., Fitzgerald D. J., Nolan K. B., Moman E. // J. Biochemistry. – 2006. – Vol. 45. – p. 811–820.
3. Ruba S. Deeb, Cynthia Cheung, Tal Nuriel, Brian D. Lamon, Rita K. Upmacis, Steven S. Gross and David P. Hajjar. Physical Evidence for Substrate Binding in Preventing Cyclooxygenase Inactivation under Nitraive Stress // J. Am. Chem.Soc. – 2010. – Vol. 132. – № 11. – p. 3914–3922.
4. Rowlison S. W., Grews B. C., Godwin D. C. et. al. Spatial requirements for 15-(R)-hydroxy-5Z, 8Z, 11Z, 13E- eicosatetraenoic acid synthesis within the cyclooxygenase active site of murine COX-2. Why acetylated COX-1 does not synthesire 15-(R)- HETE. // J. Biol. Chem. – 2000. – 275., Issue 9. – p. 6589–6591.
5. Граник В. Г., Григорьев Н. Б. Оксид азота (NO). Новый путь к поиску лекарств. – М. : Вузовская книга. – 2004. – с. 357.
6. Susanna S. C. Tam, Daniel H. S. Lee, Elizabeth Y. Wang, Donald G. Munree and Catherine Y. Lay. Tepoxalin a Novel Dual Inhibiter of the Prostaglandin – H Synthase Cyclooxygenase and Peroxidaze Activitess // J. of Biological Chemistry. – 1995. – Vol. 270. – N 23. – p. 13948–13955.
7. Богатыренко Т. Н., Куроптева З. В., Сашенкова Т. Е., Байдер Л. М., Коновалова Н. П. Использование гидроксамовых кислот и нитрата натрия для усиления противоопухолевого действия циклофосфана // Вопросы онкологии. – 2013. – Т. 59. – № 1. – с. 94–98.
8. Богатыренко Т.Н., Куроптева З.В., Байдер Л.М. и др. О возможности образования оксида азота при биотрансформации гидроксамовых кислот // Изв. РАН, Сер. Химическая. – 2011, – № 6. – с. 137–140.

9. **Руководство** по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ : методические указания по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ / сост. Трещалина Е. М., Жукова О. С., Герасимова Г. К. и др., 2000. – М., – с. 319–325.
10. **Экспериментальная** оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США / под ред. Софриной З. П., Сыркина А. Б., Голдина А., Клейна А., 2008. – М. – с. 503.
11. **Корман Д. Б.** Основы противоопухолевой химиотерапии. – М. : Практическая медицина. – 2008. – с. 503.

© T. N. Bogatyrenko, N. P. Konovalova, A. M. Sipjagin, V. R. Bogatyrenko,
T. E. Sashenkova, B. S. Vedorov, Z. V. Kuroptrva, L. M. Baider

UDC 616-085. 2/3

INTENSIFICATION OF ANTI-CANCER CHEMO-THERAPY EFFECT OF CYCLOPHOSPHAMID BY USING A HYBRID ANTI-INFLAMMATORY DRUG – NITRATE SALT OF DICLOFENAC HYDROXAMIC ACID

T. N. Bogatyrenko, N. P. Konovalova, A. M. Sipjagin, V. R. Bogatyrenko, T. E. Sashenkova,
B. S. Vedorov (Chernogolovka Russia), Z. V. Kuroptrva, L. M. Baider (Moscow, Russia)

We investigate hybrid non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), nitrate salt of diclofenac hydroxamic acid (DHA HNO₃), synthesized at the Institute of Problems of Chemical Physics (IPCP), Russian Academy of Sciences. The compound contains a typical anti-inflammatory drug NSAID, an inhibitor of cyclooxygenase (COX) activity, the hydroxaxamic group, an inhibitor of peroxylase (PO) activity, and is a donor of the nitric oxide (NO) formed in the process of HNO₃ reduction. In the present study we suggest to investigate a combined action of cytostatic cyclophosphamid (CP) and DHA HNO₃ on anti-cancer activity. We show that chemosensibilization effect of combined PC and DHA HNO₃, with therapeutic doses of PC, leads to 100 % healing of animals with leukemia P-388. Using ESR technique, we investigate the ESR signal of the active form of cyt P-450 in mouse liver samples after application of DHA HNO₃. We find that application of DHA HNO₃ leads to formation of nitrosyl cyt P-450-NO complexes, resulting in a decrease in the ESR signal of cyt P-450 within the five hours after application. The formation of P-450-NO complexes is related to nitric oxide formation in the process of HNO₃ reduction. We suggest that due to the formation of NO, the prolonged inhibition effect of cyt P-450 results in the enforced chemo-therapeutic activity of CP within the first few hours of application. We conclude that the application of the hybrid nitrate salt of diclofenac hydroxamic acid DHA HNO₃ can lead to the enforced chemo-therapeutic effect of CP and 100 % healing of animals.

Keywords: cyclophosphamid, non-steroidal anti-inflammatory drugs, hydroxaxamic acids, nitric oxide, cyt P-450, leukemia P-388, ESR spectroscopy.

REFERENCES

1. **Kudryavtsev I. A., Myasishceva N. V.** Tsiklooksigenaza-1 and-2 as targets in chemotherapy both to preventive maintenance of tumours of animals and the person // The Russian Biotherapeutic journal. – 2008. – Vol. 7. – N 3. – pp. 48–56.
2. **Chubb A. J., Fitzgerald D. J., Nolan K. B., Moman E.** // J. Biochemistry. – 2006. – Vol. 45. – p. 811–820.
3. **Ruba S. Deeb, Cynthia Cheung, Tal Nuriel, Brian D. Lamon, Rita K. Upmacis, Steven S. Gross and David P. Hajjar.** Physical Evidence for Substrate Binding in Preventing Cyclooxygenase Inactivation under Nitraive Stress // J. Am. Chem.Soc. – 2010. – Vol. 132. – № 11. – p. 3914–3922.

4. **Rowlison S. W., Grews B. C., Godwin D. C. et. al.** Spatial requirements for 15-(R)-hydroxy-5Z, 8Z, 11Z, 13E- eicosatetraenoic acid synthesis within the cyclooxygenase active site of murine COX-2. Why acetylated COX-1 does not synthesise 15-(R)- HETE. // J. Biol. Chem. – 2000. – 275., Issue 9. – p. 6589–6591.
5. **Granik V. G., Grigoriev N. B.** Oksid of nitrogen (NO). A new way to search of medicines. – M. : The High school book. – 2004. – p. 357.
6. **Susanna S. C. Tam, Daniel H. S. Lee, Elizabeth Y. Wang, Donald G. Munree and Catherine Y. Lay.** Tepoxalin a Novel Dual Inhibiter of the Prostaglandin – H Synthase Cyclooxygenase and Peroxidase Activitess // J. of Biological Chemistry. – 1995. – Vol. 270. – N 23. – p. 13948–13955.
7. **Bogatyrenko T. N., Kuropteva Z. V., Bajder L. M., etc.** Use of gidrosamov acids and nitrate of sodium for strengthening antineoplastic action of cikllofosfan // Questions of oncology. – 2013. – vol. 59. – N 1. – pp. 94–98.
8. **Bogatyrenko T. N., Kuropteva Z.V., Bajder L.M., etc.** About an opportunity of formation oxid nitrogen at biotransformation gidrosamov acids // News of Russian Academy of Science, Sulfurs / Chemical, 2011. – 6. – pp. 137–140.
9. **The Management** on experimental studying of new pharmacological substances: Methodical instructions on studying antineoplastic activity of pharmacological substances / Composers: Treshchalina E. M., Zhukova O. S., Gerasimova G. K., etc. – M., 2000. – pp. 319–325.
10. **An experimental** estimation of antineoplastic preparations to the USSR and the USA / eds. Sofrina Z. P., Syrkina A. B., Goldina A., Klein A., M. – 2008. – p. 503.
11. **Korman D. B.** Bases of antineoplastic chemotherapy. – M. : Applied medicine, 2008. – p. 503.

Bogatyrenko T. N. – Institute of Problems of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences.

E-mail: btn@icp.ac.ru

Konovalova N. P. – Institute of Problems of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences.

E-mail: ninap@icp.ac.ru

Sipjagin A. M. – Institute of Problems of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences.

E-mail: btn@icp.ac.ru

Bogatyrenko V. R. – Institute of Problems of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences.

E-mail: bvr@icp.ac.ru

Kuropteva Z. V. – N. M. Emanuel Institute of biochemical physics, Russian Academy of Sciences.

E-mail: zvkh@sky.chph.ras.ru

Bajder L. M. – N. M. Emanuel Institute of biochemical physics, Russian Academy of Sciences.

E-mail: bay42@mail.ru

Sachenkova T. E. – Institute of Problems of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences.

E-mail: btn@icp.ac.ru

Vedorov B. S. – Institute of Problems of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences.

E-mail: boris-45@inbox.ru

© Ю. Б. Бурлака, Н. В. Гринь, С. В. Верева

УДК 616-008.6 + 616-002-008.6

АМИНОКИСЛОТНЫЙ ПУЛ ПЛАЗМЫ КРОВИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ГОРТАНИ*

Ю. Б. Бурлака, Н. В. Гринь, С. В. Верева (Киев, Украина)

Возникновению и развитию злокачественных новообразований сопутствуют выраженные нарушения в промежуточном обмене и метаболизме аминокислот и их производных. Информация, получаемая при анализе аминокислотного спектра физиологических жидкостей, имеет не только сугубо теоретическое, но и практическое значение. Это исследование было проведено с целью анализа аминокислотного спектра плазмы крови больных с раком гортани для установления информативности данного критерия для оценки степени тяжести и стадии заболевания. Были проанализированы 19 аминокислот у 15 пациентов с II и III стадией рака гортани, без метаболических нарушений или других сопутствующих заболеваний. По сравнению с контрольной группой, у пациентов с раком гортани наблюдалось достоверное увеличение уровней лизина, орнитина, аспарагиновой кислоты, серина, глицина, глутаминовой кислоты, цистеина, лейцина, тирозина и фенилаланина. Таким образом, изменения уровня аминокислот служат достоверными показателями метаболического дисбаланса как важнейшего биохимического критерия развития онкологического процесса.

Ключевые слова: аминокислоты, плазма, рак гортани.

Introduction

There is abundant literature concerning the plasma concentrations of amino acids (AAs) in

various physiologic or pathologic conditions. However, it is frequently asserted that plasma levels of AAs are difficult or even impossible to interpret.

* Статья подготовлена по результатам работы Международной научно-практической конференции «Свободные радикалы и антиоксиданты в химии, биологии и медицине» (1-4 октября 2013 г.) в рамках реализации Программы стратегического развития ФГБОУ ВПО «Новосибирский государственный педагогический университет» на 2012–2016 гг.

Бурлака Юлия Борисовна – научный сотрудник лаборатории биохимии, Институт отоларингологии им. проф. О. С. Коломийченко, Национальная академия медицинских наук Украины.

E-mail: rus@ipc.tsc.ru

Гринь Наталья Викторовна – научный сотрудник лаборатории биохимии, Институт отоларингологии им. проф. О. С. Коломийченко, Национальная академия медицинских наук Украины.

E-mail: naviza@rambler.ru

Верева Сергей Викторович – доктор биологических наук, заведующий лабораторией биохимии, Институт отоларингологии им. проф. О. С. Коломийченко, Национальная академия медицинских наук Украины.

E-mail: sks-4072@mail.ru

The grounds for this assertion are that the plasma pool of free amino acids (PFAA) is very small compared with the intracellular pool of PFAA, which in turn is small compared with the protein-bound AA pool, all three being in equilibrium. In addition, AAs undergo various inter organ exchanges, which further hinder the interpretation of static plasma values. Also, there are a large number of cellular AA transport systems with overlapping properties and organ specificities [1].

As with most nutrients, plasma AA concentrations are subject to homeostasis. This means that, in physiologic situations, concentrations of each AA vary within fixed limits and are tightly regulated. The availability of plasma free amino acids is often reduced in cancer patients. The reduced availability is caused by the malnutrition in a tumor-bearing state and by an increase in the amino acid demand as a consequence of the presence of the tumor. Protein is a critical reservoir of metabolic fuel and may become seriously depleted during tumor growth. The severity of these disorders depends on the extent of the host cachetic response, which in turn is dependent on the stage and the type of the cancers [2].

Tumors in different organs can differ greatly, not only in their capacity for proliferation and metastasis, but also in the influence on the host metabolic status [3] and, consequently, in changes in the serum amino acid profile in relation to the type of tumor. Increased levels have been detected for amino acids that have certain specificities in relation to the specific type of tumor, like sarcomas [4], hepatomas [5], lung [6], breast [7], head and neck region [8], gastrointestinal [9], and bladder [10]. Other studies have shown that these amino acids return to their usual values after effective therapy, and in turn rise again when the disease relapses [11, 12].

The aim of our study was to analyze the serum amino acids in patients with oral cancer and in different stages of disease, not in the surgical period, with no nutritional alterations or other accompanying disorders, and to compare these levels with those of a healthy control group in order to try to detect specific patterns of amino acids in different stages of disease of tumors.

Material and methods

Patient selection

This prospective study included 15 patients with oral cancer, not in the surgical period, treated by Kolomiychenko Institute of Otolaryngology. The control group consisted of 10 healthy subjects without cancer or intercurrent diseases to determine the amino acid profile. The inclusion criteria were: age 18-70 years; weight loss less than 5%; advanced stage not in the surgical; no prior chemotherapy; no endocrinologic or metabolic disorders; no uncontrolled hypertension or infections; normal liver, heart and kidney function; and adequate bone marrow reserve. The inclusion criteria for the control group were: adults aged 18-70 years, good general state of health, normal nutritional and daily regimen, no intercurrent acute or chronic disease.

Laboratory measurements

The measurements consisted of the serum analysis of 19 different amino acids. The amino acids measured were: lysine, histidine, arginine, ornithine, aspartic acid, threonine, serine, glutamic acid, proline, glycine, alanine, cysteine, valine, methionine, isoleucine, leucine, tyrosine, phenylalanine, and glutamine. Measurements were made with a Beckman System 6300/7300 Amino Acid Analyzer (Pickering Laboratories) according to the manufacturer's instructions and protocols.

Statistical analyses

The mean amino-acid concentrations \pm standard deviations were calculated to determine summarized PFAA profiles for both patients and controls. Student's t-tests and Mann-Whitney U-test was used to assess significant differences of the plasma amino-acid concentrations between the patients and the controls.

Results and Discussion

The median age of the patients with II and III stage was 58 (range, 51-64). The median age of the controls, was 61 years (range, 47-67). Regarding tumor type, all patients had keratinizing squamous cell carcinoma. Three patients with stage III had metastases in node of neck. All the patients were locally advanced, non resectable and no prior treatment. Concerning the comparative analysis of the serum amino acid levels in cancer patients and the control group, the concentration of amino acids in blood was determined in $\mu\text{M/L}$ (Table I).

Analysis of the baseline serum amino acid levels between cancer patients and the healthy subjects showed significant differences in an important number of specific amino acids. In general, the mean serum concentration of the amino acids was higher in both stages of tumor studied in comparison with the normal population, except for the following amino acids: methionine, tyrosine, and glutamine. Significant increasing was seen in patients with II stage of cancer as compared with the control group in the following amino acids: lysine, ornithine, aspartic acid, serine, glutamic acid, cysteine, leucine, tyrosine, and phenylalanine. Significant differences were seen in the patients with III stage, as compared with the control group, in

lysine, ornithine, aspartic acid, glutamic acid, glycine, cysteine, leucine, tyrosine, and phenylalanine content (Table I).

Free amino acids serve as a substrate for protein synthesis, glyconeogenesis, urea genesis and other anabolic processes. Accordingly, it is logical to suppose, as has been demonstrated, that in cancer and other diseases involving an imbalance in this metabolic order, alterations take place in serum levels of amino acids [13].

After it was learnt that the presence of a tumor resulted in increased protein metabolism, studies were undertaken on variations in serum levels of amino acids as possible indicators of the influence of the tumor on the host proteins, as well as which amino acids preferably require a neoplasm for protein synthesis. In our study, we found that in patients with oral cancer, the baseline serum levels of a series of amino acids were significantly different when compared with a healthy control group. Thus, the presence of a tumor may have a decisive influence on its general metabolism, and more specifically on its protein metabolism, which would affect the serum concentration of amino acids, which usually constitute about 0.5% of the whole pool of amino acids in a person weighting 70 kg [13].

Many recent studies have tried to find out whether cancer-specific amino acid exists. Alanine and glycine have been demonstrated to be released from Walker carcinoma 256 and glycine from hepatoma 7777 cells [14]. Glutamine has been declared to be an important respiratory fuel in breast cancers [15, 16] and prostate cancers [17]. However, the role of cancer-specific amino acid remains to be clarified.

Table 1.

Baseline serum levels of amino acids in patients with oral cancer and healthy subjects and intergroup comparisons

Amino acid	Healthy subjects	Oral cancer II stage	Oral cancer III stage
Lysine	14,93±1,14	19,63±1,87*	18,50±0,89*
Histidine	7,12±0,50	7,55±0,64	7,78±0,62
Arginine	6,75±0,63	8,72±1,63	7,28±0,87
Ornithine	5,42±0,43	11,32±1,51***	10,50±0,53****
Aspartic acid	0,76±0,08	2,63±0,42****	2,37±0,25****
Threonine	10,12±0,92	12,39±1,05	10,45±0,69
Serine	8,86±0,89	11,99±1,15*	9,82±0,86
Glutamic acid	4,61±0,40	11,32±1,36****	10,97±1,59***
Proline	15,92±1,51	16,94±2,18	18,33±2,96
Glycine	19,76±1,47	26,05±3,42	27,92±3,23*
Alanine	37,27±3,52	43,37±4,07	42,63±5,97
Cysteine	6,83±0,66	10,89±1,61*	10,49±1,32*
Valine	16,96±1,24	18,58±1,20	19,77±1,69
Methionine	2,64±0,25	2,36±0,26	3,04±0,60
Isoleucine	5,46±0,40	6,11±0,69	6,74±1,12
Leucine	8,84±0,86	12,14±0,79**	12,69±1,01**
Tyrosine	8,45±0,53	5,72±0,80**	6,27±0,89*
Phenylalanine	4,19±0,23	6,40±0,43****	6,78±0,19****
Glutamine	58,28±5,69	48,17±5,11	44,40±7,47

*Significant at t-test: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,02$; *** - $p < 0,01$; **** - $p < 0,001$*

In our study, we also found increased levels of arginine, threonine, alanine (with tendency to increase) and significant increasing of ornithine and glycine (only for the III stage). Glutamine levels have tendency to decreasing. It also consistent with Kubota et al. [18] who was found increased levels of alanine, arginine and threonine in breast cancer, alanine in female G-I cancer, and ornithine in female head and neck cancer patients.

Also it is well known that cancer growth requires glutamine, glycine and aspartate for purine and pyrimidine synthesis, and serine for membrane lipid component synthesis in addition

to essential amino acids. Demand for certain amino acids may lead to a gradual loss of muscle mass, which causes the protein turnover in tissues [19] and results in a lower availability of amino acids, especially essential ones. In our series we also detect increasing ratio of those amino acids. As well as Cascino [20] we found a significant increase in glutamic acid compared with controls, suggesting that in this type of tumor may exist a certain situation of hypercatabolism preceding the cachexia.

Redistribution or translocation of peripheral protein is an essential feature of amino acid metabolism in cancer patients [21].

Cancer patients without weight loss have a threefold higher rate; while with weight loss have a lower rate of hepatic protein synthesis when compared to non-cancer patients. It has, therefore, been suggested that both malignancy and nutritional status can affect on the rate of essential amino acids in patients with oral cancer.

Moreover in our study, we found changes in tyrosine and phenylalanine content. The conversion of phenylalanine into tyrosine involves irreversible oxidation by cytosolic phenylalanine hydroxylase with tetrahydropteridine as the immediate electron donor. The hydroxylation of phenylalanine represents the principal pathway for its catabolism, and during periods of dietary tyrosine deprivation provides adequate quantities of tyrosine to nitrogen equilibrium in man. Such a close interaction between a dietary indispensable amino acid and a semi-indispensable one suggests that the kinetics for the two amino acids would be strikingly different from those for other indispensable amino acids. First, because a component of tyrosine appearance is an irreversible step in the oxidation of phenylalanine, a greater fraction of tyrosine appearance is presumed to be catabolized than would be expected with an indispensable amino acid. Secondly, the proportion of phenylalanine appearance that would be oxidized entirely to CO_2 is also expected to be considerably less than with other dietary indispensable amino acids, since the principal fate of its oxidative metabolite, tyrosine is not further degradation but incorporation into whole body protein [22].

Another important finding is the significantly high level of cysteine. It is well known that changes of cysteine level are associated with oxidative damage and metabolic disorders, which may lead to carcinogenesis. A

tissue level of cysteine is maintained at low level by tight regulation. Cysteine level may be elevated with the accumulation of homocysteine or when its catabolism is impaired due to low cysteine dioxygenase. Moreover cysteine has been considered to possess antioxidant properties through its rate-limiting role in biosynthesis of glutathione, the intracellular antioxidant and detoxifying agent. However, recent evidence from *in vivo* and *in vitro* studies have suggested that cysteine may act as a pro-oxidant agent that causes DNA oxidative damage as a result of the overproduction of free radicals and hydrogen peroxide, leading to gene mutation and subsequent cancer development [23].

Cancer cells are hypermutable [24] and may result in amino acid changes in certain protein sequences. Thus, the PFAA profile is considered valuable for diagnosis and for nutritional care in cancer patients. A large number of biological markers for cancers have been reported, including tumor-associated antigens, ectopic hormones, enzymes, and metabolic changes. Although certain cancers may metabolically differ from one another, they can induce similar derangements of the protein metabolism in the host [25]. The changes of protein metabolism, as reflected in the PFAA profiles, may be used as an additional tool for diagnosing cancer. The possibility of developing a cancer should be taken into consideration in a patient who shows abnormal PFAA levels. Meanwhile, the changes of either individual or group amino acids can be useful for the diagnosis of a specific cancer.

Summary and conclusion

Many reports have focused on the potential use of the PFAA profile as a tumor marker. These studies suggest that the metabolic alterations of various cancers can determine their own distinctive PFAA profiles. The results also

show that the sensitivity of PFAA profile for cancer diagnosis is relatively high, but the specificity is low. This all suggests that further studies are required, with neoplasm in early

stages, or more advanced stages of oral tumors, to define more precisely the deficit or excess of amino acids in this type of cancer.

REFERENCES

1. **Luc A.** Plasma Amino Acid Levels With a Note on Membrane Transport: Characteristics, Regulation, and Metabolic Significance // *Nutrition*. 2002. Vol. 18, p. 761–766.
2. **Sauer L.A., Dauchy R.T.** Pathways of energy metabolism in cancer. In: Watson RR, Mufti SI, editors. *Nutrition and cancer prevention*. Florida: CRC press; 1996. p. 128–36.
3. **Kern K.A., Norton J.A.** Cancer cachexia // *JPEN*. 1988. Vol. 12, P. 286–298.
4. **Masiar P.J., Medekova E.** The role of serine and glutamine in the metabolism of malignant bone tumors and their significance in the diagnosis and prognosis of bone tumors // *Neoplasm*. 2002. Vol. 35, P. 197–206.
5. **Watanabe A., Higashi T., Sakata T., Nagashima H.** Serum amino acid levels in patients with hepatocellular carcinoma // *Cancer*. 1984. Vol. 54, P. 1875–1882.
6. **Russell D.M., Shike M., Anderson G.H.** Amino acid metabolism in small cell lung cancer // *J. Parenter Enteral Nutr.* 1981. Vol. 6, P. 592.
7. **Cascino A., Muscaritoli M., Cangiano C., et al.** Plasma amino acid imbalance in patients with lung and breast cancer // *Anticancer Res.* 1995. Vol. 15, P. 507–510.
8. **Ching N., Grossi C., Jham C.** Plasma amino acid deficits and the effect of nutritional support in chemotherapy treatment // *Surgery*. 1984. Vol. 95, P. 730–737.
9. **Tayek J.A., Sutter L., Manglik S., Lillington L.B., Grosvenor M., Chlebowski R. T.** Altered metabolism and mortality in patients with colon cancer receiving chemotherapy // *Am. J. Med. Sci.* 1995. Vol. 310, P. 48–55.
10. **Nechiporenko N.A., Nefedov L.I., Klimovich I.I.** The free amino acid content of the blood serum in bladder cancer patients // *Urol. Nephrol.* 1990. Vol. 5, P. 17–20.
11. **Elling D., Bader K., Schicke B.** Free serum amino acids in patients with tumors of different sites - tumor induced imbalances // *Centrally Gynecol.* 1987. Vol. 109, P. 1023–1032.
12. **Kuzer M., Janizewski J., Meguid M.M.** Amino acid profiles in tumor-bearing and pair-fed nontumor-bearing malnourished rats. // *Cancer*. 1988. Vol. 62, P. 30–34.
13. **Cobo Dols M., Domínguez López M., Ramírez Plaza C., Pérez Miranda E., Gil Calle S. et al.** Specific alterations in the serum amino acid profile of patients with lung cancer and head and neck cancer // *Oncología*. 2006. Vol. 29 (7), P. 283–290.
14. **Hong-Shiee Lai, Jenq-Chang Lee, Po-Huang Lee, Shan-Tair Wang, Wei-Jao Che.** Plasma free amino acid profile in cancer patients // *Seminars in Cancer Biology*. 2005. Vol. 15, P. 267–276.
15. **Johnson A.T., Kaufmann Y.C., Luo S., Todorova V., Klimberg V.S.** Effect of glutamine on glutathione, IGF-I, and TGF-beta 1 // *J. Surg. Res.* 2003. Vol. 111, P. 222–228.
16. **Kaufmann Y., Luo S., Johnson A., Babb K., Klimberg V. S.** Timing of oral glutamine on DMBA-induced tumorigenesis // *J. Surg. Res.* 2003. Vol. 111, P. 158–165.
17. **Lamb D.J., Puxeddu E., Malik N., Stenoien D. L., Nigam R., Saleh G. Y., et al.** Molecular analysis of the androgen receptor in ten prostate cancer specimens obtained before and after androgen ablation // *J. Androl.* 2003. Vol. 24, P. 215–225.
18. **Kubota A., Meguid M. M., Hitch D. C.** Amino acid profiles correlate diagnostically with organ site in three kinds of malignant tumors // *Cancer*. 1992. Vol. 69, P. 2343–2348.

19. **Proenza A.M., Oliver J., Palou A., Roca P.** Breast and lung cancer are associated with a decrease in blood cell amino acid content // *J. Nutr. Biochem.* 2003. Vol. 14, P. 133–138.
20. **Cascino A., Muscaritoli M., Cangiano C., et al.** Plasma amino acid imbalance in patients with lung and breast cancer // *Anticancer Res.* 1995. Vol. 15, P. 507–510.
21. **Pisters P. W., Pearlstone D. B.** Protein and amino acid metabolism in cancer cachexia: investigative techniques and therapeutic interventions // *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 1993. Vol. 30, P. 223–272.
22. **Cascino A., Muscaritoli M., Cangiano C., Conversano L., Laviano A., Ariemma S., et al.** Plasma amino acid imbalance in patients with lung and breast cancer // *Anticancer Res.* 1995. Vol. 15, P. 507–510.
23. **Georgiannos S. N., Weston P. M., Goode A. W.** Correlation between albuminuria and positively charged amino acids in gastrointestinal cancer // *Int. Surg.* 1995. Vol. 80, P. 49–52.
23. **Strauss B.S.** Hypermutability and silent mutations in human carcinogenesis // *Semin. Cancer Biol.* 1998. Vol. 8, P. 431–438.
24. **Lorite M. J., Cariuk P., Tisdale M. J.** Induction of muscle protein degradation by a tumour factor // *Br. J. Cancer.* 1997. Vol. 76, P. 1035–1040.

© I. B. Burlaka, N. V. Gryn', S. V. Verevka

UDC 616-008.6 + 616-002-008.6

PLASMA FREE AMINO ACID PROFILE IN PATIENTS WITH ORAL CANCER*I. B. Burlaka, N. V. Gryn', S. V. Verevka (Kiev, Ukraine)*

Metabolic changes in patients with cancer lead to alterations in their amino-acid balances. Thus, amino acid profiles may be useful as biomarkers of cancers. This study was conducted to analyze amino-acid profiles in plasma in order to elucidate differences between cancer patients and controls. We analyzed the baseline serum levels of 19 amino acids in 15 patients with II and III stages of oral cancer with no metabolic alterations or other concomitant disorders and compared the results with a control group. Compared with the control group, patients with oral cancer had significant differences in lysine, ornithine, aspartic acid, serine, glycine, glutamic acid, cysteine, leucine, tyrosine, and phenylalanine. This study revealed significant differences in plasma amino acid profiles between cancer patients and controls. The development of a cancer alters plasma amino-acid profiles and the pattern of change differs between different stages of oral cancer. Plasma amino-acid profiling might therefore be useful for the early detection of cancer.

Keywords: amino acid profiles, plasma, screening, cancer.

REFERENCES

1. **Luc A.** Plasma Amino Acid Levels With a Note on Membrane Transport: Characteristics, Regulation, and Metabolic Significance // Nutrition. 2002. Vol. 18, p. 761–766.
2. **Sauer L.A., Dauchy R.T.** Pathways of energy metabolism in cancer. In: Watson RR, Mufti SI, editors. Nutrition and cancer prevention. Florida: CRC press; 1996. p. 128–36.
3. **Kern K.A., Norton J.A.** Cancer cachexia // JPEN. 1988. Vol. 12, P. 286–298.
4. **Masiar P.J., Medekova E.** The role of serine and glutamine in the metabolism of malignant bone tumors and their significance in the diagnosis and prognosis of bone tumors // Neoplasia. 2002. Vol. 35, P. 197–206.
5. **Watanabe A., Higashi T., Sakata T., Nagashima H.** Serum amino acid levels in patients with hepatocellular carcinoma // Cancer. 1984. Vol. 54, P. 1875–1882.
6. **Russell D.M., Shike M., Anderson G.H.** Amino acid metabolism in small cell lung cancer // J. Parenter Enteral Nutr. 1981. Vol. 6, P. 592.
7. **Cascino A., Muscaritoli M., Cangiano C., et al.** Plasma amino acid imbalance in patients with lung and breast cancer // Anticancer Res. 1995. Vol. 15, P. 507–510.
8. **Ching N., Grossi C., Jham C.** Plasma amino acid deficits and the effect of nutritional support in chemotherapy treatment // Surgery. 1984. Vol. 95, P. 730–737.
9. **Tayek J.A., Sutter L., Manglik S., Lillington L.B., Grosvenor M., Chlebowski R. T.** Altered metabolism and mortality in patients with colon cancer receiving chemotherapy // Am. J. Med. Sci. 1995. Vol. 310, P. 48–55.
10. **Nechiporenko N.A., Nefedov L.I., Klimovich I.I.** The free amino acid content of the blood serum in bladder cancer patients // Urol. Nephrol. 1990. Vol. 5, P. 17–20.

11. **Elling D., Bader K., Schicke B.** Free serum amino acids in patients with tumors of different sites - tumor induced imbalances // Centrally Gynecol. 1987. Vol. 109, P. 1023–1032.
12. **Kuzer M., Janizewski J., Meguid M.M.** Amino acid profiles in tumor-bearing and pair-fed nontumor-bearing malnourished rats. // Cancer. 1988. Vol. 62, P. 30–34.
13. **Cobo Dols M., Domínguez López M., Ramírez Plaza C., Pérez Miranda E., Gil Calle S. et al.** Specific alterations in the serum amino acid profile of patients with lung cancer and head and neck cancer // Oncología. 2006. Vol. 29 (7), P. 283–290.
14. **Hong-Shiee Lai, Jenq-Chang Lee, Po-Huang Lee, Shan-Tair Wang, Wei-Jao Che.** Plasma free amino acid profile in cancer patients // Seminars in Cancer Biology. 2005. Vol. 15, P. 267–276.
15. **Johnson A.T., Kaufmann Y.C., Luo S., Todorova V., Klimberg V.S.** Effect of glutamine on glutathione, IGF-I, and TGF-beta 1 // J. Surg. Res. 2003. Vol. 111, P. 222–228.
16. **Kaufmann Y., Luo S., Johnson A., Babb K., Klimberg V. S.** Timing of oral glutamine on DMBA-induced tumorigenesis // J. Surg. Res. 2003. Vol. 111, P.158–165.
17. **Lamb D.J., Puxeddu E., Malik N., Stenoien D. L., Nigam R., Saleh G. Y., et al.** Molecular analysis of the androgen receptor in ten prostate cancer specimens obtained before and after androgen ablation // J. Androl. 2003. Vol. 24, P. 215–225.
18. **Kubota A., Meguid M. M., Hitch D. C.** Amino acid profiles correlate diagnostically with organ site in three kinds of malignant tumors // Cancer. 1992. Vol. 69, P. 2343–2348.
19. **Proenza A.M., Oliver J., Palou A., Roca P.** Breast and lung cancer are associated with a decrease in blood cell amino acid content // J. Nutr. Biochem. 2003. Vol. 14, P. 133–138.
20. **Cascino A., Muscaritoli M., Cangiano C., et al.** Plasma amino acid imbalance in patients with lung and breast cancer // Anticancer Res. 1995. Vol. 15, P. 507–510.
21. **Pisters P. W., Pearlstone D. B.** Protein and amino acid metabolism in cancer cachexia: investigative techniques and therapeutic interventions // Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 1993. Vol. 30, P. 223–272.
22. **Cascino A., Muscaritoli M., Cangiano C., Conversano L., Laviano A., Ariemma S., et al.** Plasma amino acid imbalance in patients with lung and breast cancer // Anticancer Res. 1995. Vol. 15, P. 507–510.
23. **Georgiannos S. N., Weston P. M., Goode A. W.** Correlation between albuminuria and positively charged amino acids in gastrointestinal cancer // Int. Surg. 1995. Vol. 80, P. 49–52.
23. **Strauss B. S.** Hypermutability and silent mutations in human carcinogenesis // Semin. Cancer Biol. 1998. Vol. 8, P. 431–438.
24. **Lorite M. J., Cariuk P., Tisdale M. J.** Induction of muscle protein degradation by a tumour factor // Br. J. Cancer. 1997. Vol. 76, P. 1035–1040.

Burlaka Iuliya Borisovna – the scientific worker of laboratory of biochemistry Academy of Medical Sciences of Ukraine prof. O. S. Kolomiychenko Institute of Otolaryngology.

E-mail: rus@ipc.tsc.ru

Gryn' Natalia Viktorovna – the scientific worker of laboratory of biochemistry, Academy of Medical Sciences of Ukraine prof. O. S. Kolomiychenko Institute of Otolaryngology.

E-mail: naviza@rambler.ru

Verevka Sergey Viktorovich – Dr.Sci.Biol., the head of Biochemistry department, Academy of Medical Sciences of Ukraine prof. O. S. Kolomiychenko Institute of Otolaryngology.

E-mail: sks-4072@mail.ru

© А. Г. Давыдовский

УДК 577.112.4 + 303.732.4 + 517.977.1

СИСТЕМНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ КОМПОЗИЦИЙ АНТИОКСИДАНТОВ В МАЛЫХ ДОЗАХ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА ПРИ ТОКСИКО-СЕПТИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ*

А. Г. Давыдовский (Минск, Беларусь)

Целью исследования было изучение возможности выбора рациональных композиций антиоксидантов метаболического действия в малых дозах в лабораторных тестах in vitro, а также оценка их эффективности при коррекции окислительного стресса при экспериментальном моделировании токсико-септических состояний in vivo, таких как эндотоксиновый шок, с помощью критериев оптимальности решения в условиях неопределенности. Были охарактеризованы метаболические корректоры антиоксидантного действия, обеспечивающие нормализацию про- и антиокислительных процессов, а также коррекцию нарушений температурного гомеостаза организма при эндотоксиновом шоке.

Ключевые слова: окислительный стресс, антиоксиданты, метаболическая коррекция, критерии принятия решений, системный анализ.

Введение

В патогенезе токсико-септических состояний, таких как бактериальные инфекции, холестаз, хронические вирусные и лекарственные гепатиты, жировая дистрофия печени, тяжелые травмы и раневые инфекции, гнойные перитониты, тяжелые травмы и раневые инфекции, сопровождающиеся развитием синдрома системного воспалительного ответа, синдрома эндогенной интоксикации и синдрома полиорганной недостаточности [1, с. 18–20], важнейшую роль играет системный окислительный стресс (ОС), обусловленный интенсивной продук-

цией кислородных радикалов, индуцирующих свободно-радикальное перекисное окисление липидов (ПОЛ), дезорганизацией механизмов энергетического обмена и снижением эффективности антиокислительной системы (АОС) [2, с. 17–18]. При этом одним из перспективных направлений коррекции токсико-септических состояний является использование метаболических корректоров на основе композиций антиоксидантов метаболического действия (АМД), включая α -липоевую, аскорбиновую и никотиновую кислоту, а также пиридоксина и тиамина [3, с.572-573; 4, с.107-129],

* Статья подготовлена по результатам работы Международной научно-практической конференции «Свободные радикалы и антиоксиданты в химии, биологии и медицине» (1-4 октября 2013 г.) в рамках реализации Программы стратегического развития ФГБОУ ВПО «Новосибирский государственный педагогический университет» на 2012–2016 гг.

Давыдовский Анатолий Григорьевич – кандидат биологических наук, доцент кафедры педагогики и проблем развития образования, Белорусский государственный университет.

E-mail: agd2011@list.ru

что позволит минимизировать последствия ОС как одной из важнейших патогенетических составляющих токсико-септических состояний. АМД реализуют свой антиокислительный эффект через метаболические процессы, контролирующие ключевые механизмы внутриклеточной АОС. В организме наиболее значительный антиокислительный эффект можно ожидать при совместном применении АМД в малых и сверхмалых дозах, соответствующих концентрациям от 10^{-5} до 10^{-11} М, в которых зависимость «доза-эффект» имеет сложный полимодальный характер [5, с.402]. В связи с этим можно предположить высокую степень неопределенности и риска при использовании АМД в диапазоне малых и сверхмалых доз.

Эффективность АМД может быть охарактеризована на основе оценки соотношения между возможностью достижения антиокислительного эффекта, как «выигрыша» от применения АМД по общей антиокислительной активности (АОА) и коэффициенту антиокислительно-проокислительного баланса (Капб), с одной стороны, а также величины риска отсутствия желательного позитивного эффекта в условиях ОС при токсико-септических состояниях, с другой стороны. Для оптимального выбора наиболее эффективных концентраций АМД полезно использовать критерии оптимальности решений в условиях неопределенности, включая критерии пессимизма-оптимизма Гурвица и минимального риска Сэвиджа, а также критерий взвешенного выигрыша и критерий взвешенного риска [6, с. 251–261], используемых в системном анализе биологических систем и процессов в норме и при патологии, а также медико-биологических исследованиях.

В связи с этим, **целью исследования** было изучение возможности выбора рациональных композиций антиоксидантов метаболического действия в малых дозах в лабораторных тестах *in vitro*, а также оценка их эффективности при коррекции окислительного стресса при экспериментальном моделировании токсико-септических состояний (эндотоксического шока) *in vivo* с помощью критериев оптимальности решения в условиях неопределенности.

Объекты, материалы и методы исследования

Объекты и материалы исследования.

В качестве объекта исследования были использованы эритроциты периферической крови здоровых доноров-добровольцев. Также в исследовании были использованы экспериментальные животные – 96 беспородных белых крыс-самцов. Кровь доноров или экспериментальных животных помещали в пластмассовую посуду, содержащую антикоагулянты (гепарин). Эритроциты отмывали стандартным способом и немедленно вводили в эксперимент. В исследовании были использованы коммерческие препараты α -липоевой кислоты («Тиоктацид ®600Т») (Виатрикс ГмбХ и Ко. КГ, Франкфурт, Германия) и никотиновой кислоты («Дарница», Киев, Украина), препараты тиамин, пиридоксин, аскорбиновой кислоты и пентоксифиллина были производства Республики Беларусь.

Моделирование окислительного стресса *in vitro*.

Экспериментальное моделирование ОС *in vitro* осуществляли добавлением в суспензию эритроцитов пероксида водорода в конечной концентрации 50 мкМ с

последующей инкубацией 60 мин при 37 °С. Контрольные пробы содержали физиологический раствор (0,15 М).

Исследование эффективности композиций антиоксидантов. В условиях экспериментального моделирования ОС *in vitro* были охарактеризованы эффекты 92 вариантов метаболических корректоров, составленных на основе двух-, трех-, четырех- и пятикомпонентных композиций, содержащих такие АМД, как:

1) альфа-липоевая кислота (тиоктацид) в конечных концентрациях $1,25 \times 10^{-5}$ М; $1,25 \times 10^{-7}$ М; $1,25 \times 10^{-9}$ М; $1,25 \times 10^{-11}$ М;

2) аскорбиновая кислота (5% раствор): 3×10^{-5} М; 3×10^{-7} М; 3×10^{-9} М; 3×10^{-11} М;

3) никотиновая кислота (1% раствор): 10^{-5} М; 10^{-7} М; 10^{-9} М; 10^{-11} М;

4) пиридоксин (5% раствор): 3×10^{-5} М; 3×10^{-7} М; 3×10^{-9} М; 3×10^{-11} М;

5) тиамин (5% раствор): $1,5 \times 10^{-5}$ М; $1,5 \times 10^{-7}$ М; $1,5 \times 10^{-9}$ М; $1,5 \times 10^{-11}$ М.

Повторная постановка каждого эксперимента *in vitro* производилась семикратно (n=7). Препараты АМД в различных концентрациях вносили в экспериментальную модель ОС *in vitro*.

Характеристика перекисного окисления липидов и антиокислительной активности. Интенсивность процессов ПОЛ оценивали по накоплению продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБКРП), в условиях спонтанного и индуцированного (в Fe^{2+} -аскорбатной системе) свободно-радикального окисления в мембранах эритроцитов при инкубации в течение 30 мин при 37°С. Интенсивность накопления ТБКРП оценивали по накоплению в мембранах эритроцитов с помощью модифицированной методики, основанной на образовании окрашенного триметинового комплекса, интенсивность

окраски которого измерялась при длине волны 532 нм на спектрофотометре СФ-26 (ЛОМО, СССР), принимая коэффициент молярной экстинкции комплекса ТБК-РП равным $1,56 \times 10^5 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

Общая АОА в мембранах эритроцитов была рассчитана по формуле [2, с.30]:

$$\text{АОА} = (\text{ТБКРП}_{\text{инд}} - \text{ТБКРП}_{\text{сп}}) / \text{ТБКРП}_{\text{инд}} \quad (1),$$

где $\text{ТБКРП}_{\text{инд}}$ – уровень ТБКРП в условиях Fe(II) -аскорбатной системы индукции ПОЛ, $\text{ТБКРП}_{\text{сп}}$ – уровень ТБКРП при спонтанном ПОЛ.

Уровень общей проокислительной активности (ПОА) и коэффициент антиокислительно-проокислительного баланса (Капб) рассчитывали, соответственно, по формулам:

$$\text{ПОА} = \text{ТБКРП}_{\text{сп}} / \text{ТБКРП}_{\text{инд}} \quad (2),$$

$$\text{Капб} = \text{АОА} / \text{ПОА} = \text{ТБКРП}_{\text{сп}} / (\text{ТБКРП}_{\text{инд}} - \text{ТБКРП}_{\text{сп}}) \quad (3).$$

Экспериментальное моделирование эндотоксического шока (ЭШ) *in vivo* осуществляли путем внутрибрюшинного введения бактериального липополисахарида *Escherichia coli* (ЛПС *E. coli*) в дозе 20 мг/кг экспериментальным животным – беспородным белым крысам-самцам. В исследовании были использованы 4 группы экспериментальных животных:

1) контроль (n=8), животным вводили физраствор;

2) ЭШ (n=8), индуцированный ЛПС *E. coli* в дозе 20 мг/кг;

3) изучение особенностей влияния эффективности метаболических корректоров № 1–5 на состояние про- и антиокислительных процессов в крови, а также температурный гомеостаз организма (n=40);

4) изучение эффективности метаболических корректоров № 1–5 на баланс про- и антиокислительных процессов в крови, а также температурный гомеостаз организма в условиях ЭШ, индуцированного ЛПС *E.coli* в дозе 20 мг/кг (n=40).

Исследование температуры тела экспериментальных животных осуществляли путем контактной термометрии с помощью контактного термометра Microlife MT16F1 (Microlife, Switzerland), была изучена глубокая температура тела лабораторных животных в течение 6 часов после системного введения бактериального липополисахарида *Escherichia coli* (ЛПС *E. coli*). Исследования с участием экспериментальных животных выполнялись с соблюдением всех соответствующих этических правил и норм.

Анализ критериев принятия решений в условиях неопределенности. Для анализа эффективности метаболических корректоров, сформированных на основе каждого из АД, были использованы такие критерии оптимальности решений в условиях неопределенности, как критерии Гурвица, Сэвиджа, взвешенного риска и взвешенного выигрыша [6, с. 251–261].

Критерий пессимизма-оптимизма (КПО) Гурвица ориентирован при выборе оптимальной стратегии использования АД ни на крайний оптимизм, ни на крайний пессимизм. Оптимальная стратегия вычисляется как:

$$КПО = \max(k * \min a_{ij} + (1-k) * \max a_{ij}) \quad (4),$$

где k – коэффициент оптимизма ($0 \leq k \leq 1$), a_{ij} – соответствующие показатели АОО или Капб на основе анализа массива экспериментальных данных.

Критерий минимального риска (КМР)

Сэвиджа ориентирован не на выигрыш, а на риск. При этом оптимальная стратегия рассчитывается как:

$$КМР = (1 - k) * \max b_{ij} + k * \min b_{ij} \quad (5),$$

где k – коэффициент оптимизма ($0 \leq k \leq 1$), а b_{ij} рассчитывается как:

$$b_{ij} = \max a_{ij} - a_{ij} \quad (6).$$

При этом в качестве оптимальной выбирается та стратегия использования АД, при которой величина риска отсутствия антиокислительного эффекта минимальна.

Критерий взвешенного выигрыша (ВВ), может быть рассчитан как:

$$ВВ(I_i) = B(I_i) - g * \sigma(I_i) \quad (7),$$

где g – показатель риска, предпочитаемый в исследовании ($g > 0$), причем чем больше g , тем меньше риск, допустимый в исследовании.

Критерий ВВ предполагает совместный учет двух факторов:

1) среднего выигрыша (критерий Байеса), который получается при многократном повторении i -го опыта (I_i); а также

2) среднеквадратического отклонения выигрыша от среднего $\sigma B(I_i)$. Последний рассчитывается как:

$$\sigma B(I_i) = \sqrt{\sum_{j=1}^L S_{ij} * (a_{ij} - B(I_i))^2} \quad (8),$$

где S_{ij} – величина вероятности каждого из эффектов определенного АД по показателям АОО или Капб;

$B(I_i)$ – средний выигрыш по критерию Байеса для данной стратегии выбора эффекта АД:

$$B(I_i) = \sum_{j=1}^L a_{ij} * S_{ij} \quad (9).$$

Критерий взвешенного риска (КВР)

предполагает совместный учет среднего риска для i -й альтернативы – $\Pi(I_i)$ и среднеквадратического отклонения риска от среднего значения $\sigma\Pi(I_i)$. При этом КВР рассчитывается как:

$$КВР = \Pi(I_i) + g * \sigma \Pi(I_i) \quad (10),$$

где средний риск для i -й альтернативы $\Pi(I_i)$ равен:

$$\Pi(I_i) = \sum_{j=1}^L b_{ij} * S_{ij} \quad (11),$$

а среднеквадратическое отклонение риска от среднего значения $\sigma\Pi(I_i)$ определяется выражением:

$$\sigma \Pi(I_i) = \sqrt{\sum_{j=1}^L S_{ij} * (b_{ij} - \Pi(I_i))^2} \quad (12).$$

Для дальнейшего исследования выбирали тот вариант эффекта АМД, при котором средний риск $\Pi(I_i)$ был минимален.

Кроме того, впервые были использованы средневзвешенные критериальные показатели выигрыша и риска, полученные на основе весового анализа, соответственно, критериев выигрыша и критериев риска.

При этом существует определенный риск нежелательного исхода при выборе той или иной альтернативы. Может быть использована следующая шкала допустимого риска в зависимости от вероятности риска P :

- 1) $0 \leq P \leq 0,1$ – минимальный риск;
- 2) $0,1 \leq P \leq 0,3$ – малый риск;
- 3) $0,3 \leq P \leq 0,4$ – средний риск;
- 4) $0,4 \leq P \leq 0,6$ – высокий риск;
- 5) $0,6 \leq P \leq 0,8$ – максимальный риск.

Результаты экспериментальных исследований

В таблице представлены усредненные результаты исследования ($n=7$) влияния АМД в диапазоне концентраций от 10^{-5} до 10^{-11} М на показатели общей АОА, общей ПОА и Капб в эритроцитах человека в условиях экспериментального моделирования ОС *in vitro*. В таблице также представлены усредненные результаты расчета критериев пессимизма-оптимизма Гурвица, минимального риска Сэвиджа, Байесовского критерия, критериев взвешенного выигрыша и взвешенного риска, а также средневзвешенных критериальных показателей выигрыша и риска для показателей общей АОА и Капб.

Анализ результатов, полученных по критериям выигрыша и риска, а также средневзвешенных критериальных показателей выигрыша и риска позволяет заключить, что наибольший выигрыш характерен для α -липоата в концентрациях 10^{-5} и 10^{-9} М, тогда как наименьший риск снижения АОА сопровождается применением препарата в концентрациях 10^{-11} М.

Вместе с тем, применение аскорбиновой кислоты в концентрациях 10^{-9} М сопровождается развитием антиокислительного эффекта с наибольшим выигрышем и таким же риском, а в концентрации 10^{-7} М – достаточно высоким выигрышем и сравнительно малым риском снижения АОА.

Таблица 1.

Характеристика эффективности влияния антиоксидантов метаболического действия в диапазоне концентраций от 10^{-5} до 10^{-11} М на показатели антиокислительной активности (АОА) и коэффициент антиокислительно-проокислительного баланса (Капб) на основе критериев пессимизма-оптимизма Гурвица, минимального риска Сэвиджа, Байесовского критерия, критериев взвешенного выигрыша и взвешенного риска, а также средневзвешенных критериальных показателей выигрыша и риска (представлены средние показатели, $n=7$).

№ п/ п	Исследованные параметры	Контроль	Альфа-липоевая кислота				Аскорбино- вая кислота				Никотиновая кислота				Пиридоксин				Тимин				
			-lgM																				
			5	7	9	11	5	7	9	11	5	7	9	11	5	7	9	11	5	7	9	11	
1	АОА(min)	0,5	0,7	0,6	0,6	0,6	0,6	0,7	0,6	0,6	0,6	0,6	0,7	0,7	0,7	0,7	0,6	0,5	0,6	0,5	0,6	0,6	0,7
2	АОА(max)	0,6	0,8	0,8	0,8	0,7	0,7	0,8	0,8	0,7	0,7	0,7	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,7	0,7	0,7	0,8	0,8
3	ПОА(min)	0,4	0,2	0,3	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2
4	ПОА(max)	0,5	0,3	0,4	0,4	0,5	0,4	0,3	0,4	0,5	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3	0,4	0,5	0,5	0,5	0,4	0,4	0,3
5	Капб(min)	1,0	2,0	1,5	1,3	1,2	1,7	2,0	1,5	1,2	1,5	1,5	1,8	2,0	2,0	1,7	1,0	1,2	1,0	1,5	1,5	2,4	2,4
6	Капб(max)	1,8	3,8	3,0	3,7	2,3	2,8	3,3	3,7	2,5	2,5	2,8	3,3	3,3	3,8	3,0	3,0	2,0	2,3	2,8	3,7	3,3	3,3
7	Критерий Гурвица (АОА)	0,6	0,8	0,7	0,7	0,6	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,8	0,7	0,7	0,6	0,6	0,7	0,7	0,7	0,7
8	Критерий Сэвиджа (АОА)	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0
9	Байесовский критерий выигрыша (АОА)	0,5	0,7	0,7	0,7	0,6	0,7	0,7	0,7	0,6	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,6	0,6	0,6	0,7	0,7	0,7	0,7
10	Критерий взвешенного выигрыша (АОА)	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3
11	Критерий среднего риска (АОА)	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
12	Критерий взвешенного риска (АОА)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
13	Критерий Гурвица (Капб)	1,5	3,2	2,6	3,0	1,9	2,4	2,9	3,0	2,1	2,2	2,4	2,8	2,9	3,2	2,6	2,4	1,8	1,9	2,4	3,0	3,0	3,0
14	Байесовский критерий выигрыша (Капб)	1,3	2,9	2,3	2,5	1,8	2,3	2,7	2,6	1,8	1,9	2,0	2,6	2,7	2,9	2,4	2,1	1,6	1,7	2,1	2,6	2,7	2,7
15	Критерий взвешенного выигрыша (Капб)	0,4	1,2	0,6	0,5	0,6	0,9	0,7	0,6	0,8	0,6	0,5	0,7	1,0	1,2	0,6	0,5	0,6	0,7	0,5	0,6	1,0	1,0

16	Критерий среднего риска (Кпаб)	0,7	1,4	1,1	2,0	0,8	0,8	0,9	1,8	1,1	0,8	1,0	1,2	1,0	1,4	0,9	1,5	0,7	0,9	1,0	1,8	0,8
17	Критерий взвешенного риска (Кпаб)	0,1	0,4	0,3	0,4	0,2	0,3	0,3	0,4	0,2	0,2	0,1	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,2	0,3	0,2	0,4	0,2
18	Средневзвешенный выигрыш	1,1	2,4	1,9	2,1	1,4	1,8	2,1	2,2	1,5	1,6	1,7	2,1	2,1	2,4	1,9	1,8	1,3	1,4	1,7	2,2	2,2
19	Средневзвешенный риск	0,5	1,1	0,8	1,6	0,6	0,6	0,7	1,4	0,8	0,6	0,8	1,0	0,8	1,1	0,7	1,1	0,5	0,6	0,8	1,4	0,6

Внесение в суспензию эритроцитов никотиновой кислоты в концентрациях 10^{-9} М сопровождается наибольшим уровнем выигрыша при минимальном приемлемом уровне риска. При этом пиридоксин в концентрации 10^{-5} М обеспечивает антиокислительный эффект с наибольшим выигрышем, а его применение в концентрации 10^{-11} М позволяет достичь наименьшего риска.

В свою очередь, применение тиамин в концентрациях 10^{-11} М позволяет получить максимальный выигрыш при минимальном риске, тогда как использование концентрации 10^{-9} М позволяет достичь наибольший уровень не только выигрыша, но и риска потери антиокислительной эффективности. Следует отметить, что тиамин в концентрации 10^{-5} М характеризуется минимальным выигрышем при таком же риске.

Таким образом, на основе анализа критериев оптимальности решения в условиях неопределенности могут быть выбраны АД в сравнительно оптимальных концентрациях, обеспечивающих наибольшее повышение АОА при снижении ПОА в клеточных тест-системах – эритроцитах.

На рисунках 1 и 2 представлены кривые, характеризующие динамику средневзвешенных критериев, соответственно, выигрыша и риска

эффективности применения АД в широком диапазоне концентраций. Очевидно, что применение α -липоевой, аскорбиновой и никотиновой кислоты, а также тиамин в диапазоне концентраций от 10^{-7} до 10^{-10} М характеризуется значительным повышением уровня выигрыша на фоне возрастания риска снижения или отсутствия антиокислительного эффекта от использования вышеуказанных АД.

Результаты экспериментальных исследований влияния АД, взятых в различных концентрациях, на величину выигрыша или риска развития антиокислительного эффекта были аппроксимированы трендами, задаваемыми полиномиальной функцией пятой степени, с высоким уровнем достоверности ($R^2=1$). Результаты аппроксимации представлены на рисунках 1 и 2. С помощью уравнений, полученных при аппроксимации, можно оценить уровни выигрыша или риска развития антиокислительного эффекта исследованных препаратов, задавая в качестве аргумента интересующую концентрацию АД.

На основе результатов исследования были отобраны 5 метаболитических корректоров сложного состава:

- 1) α -липоевая кислота ($1,25 \cdot 10^{-5}$ М), тиамин ($1,5 \cdot 10^{-11}$ М), никотиновая кислота (10^{-11} М);

- 2) α -липовая кислота ($1,25 \cdot 10^{-5}$ М), тиамин ($1,5 \cdot 10^{-11}$ М), никотиновая кислота (10^{-11} М), пиридоксин ($3 \cdot 10^{-5}$ М) и аскорбиновая кислота ($3 \cdot 10^{-5}$ М);
- 3) α -липовая кислота ($1,25 \cdot 10^{-5}$ М), тиамин ($1,5 \cdot 10^{-11}$ М), никотиновая кислота (10^{-11} М), пиридоксин ($3 \cdot 10^{-7}$ М) и аскорбиновая кислота ($3 \cdot 10^{-7}$ М);
- 4) α -липовая кислота ($1,25 \cdot 10^{-7}$ М), тиамин ($1,5 \cdot 10^{-11}$ М), никотиновая кислота (10^{-11} М), аскорбиновая кислота ($3 \cdot 10^{-7}$ М);
- 5) тиамин ($1,5 \cdot 10^{-7}$ М), аскорбиновая кислота ($3 \cdot 10^{-7}$ М), пентоксифиллин ($3,5 \cdot 10^{-5}$).

6) Эффективность вышеназванных метаболических корректоров была изучена в условиях экспериментального моделирования ЛПС-индуцированного ЭШ in vivo. Причем применение метаболических корректоров №2 и №5 сопровождалось компенсацией системного ОС при ЛПС-индуцированном ЭШ, о чем свидетельствовало повышение АОА в 1,2–1,5 раз ($P < 0,05$) при снижении ПОА и Кпаб более чем на 30% ($P < 0,05$) в эритроцитах периферической крови экспериментальных животных по сравнению с контролем.

Рисунок 1.

Динамика средневзвешенного критерия выигрыша эффективности применения антиоксидантов метаболического действия в широком диапазоне концентраций (на оси абсцисс – обратный логарифм концентрации в молях, $-\lg(M)$).

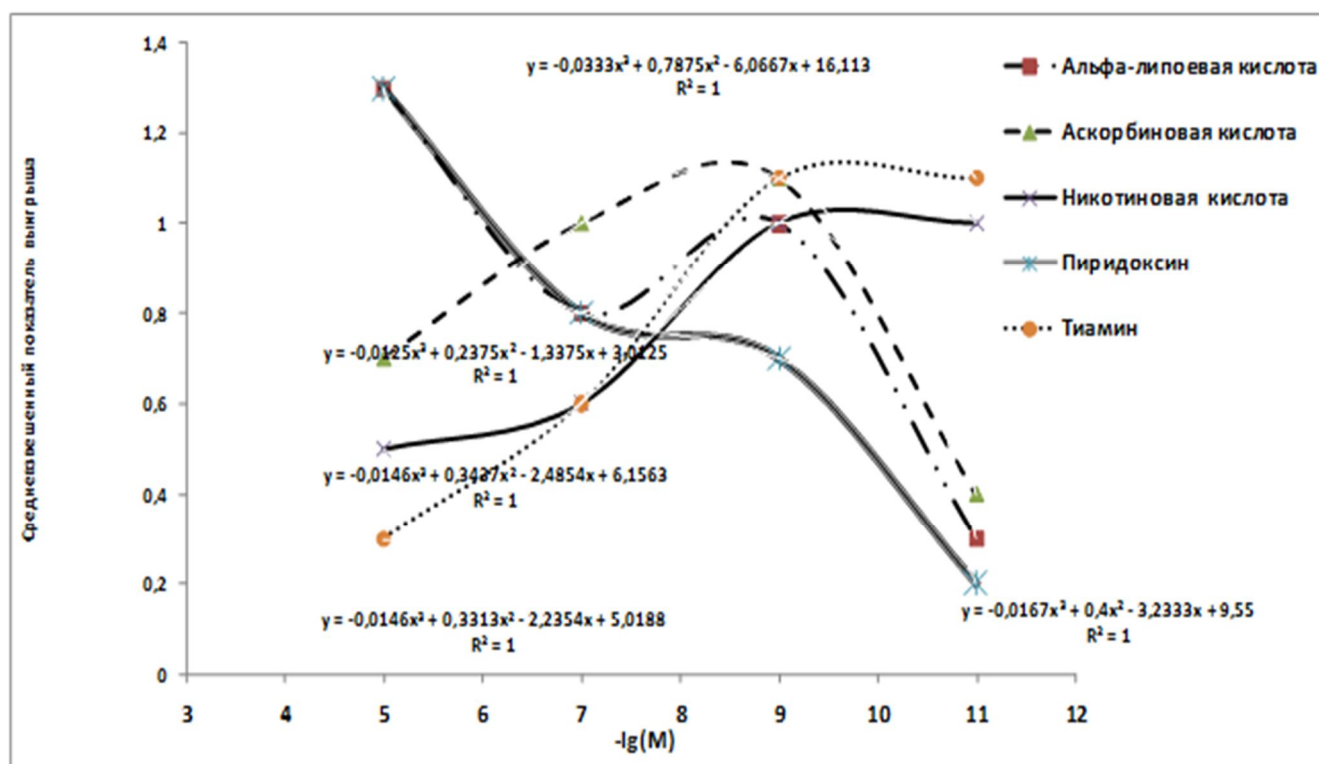
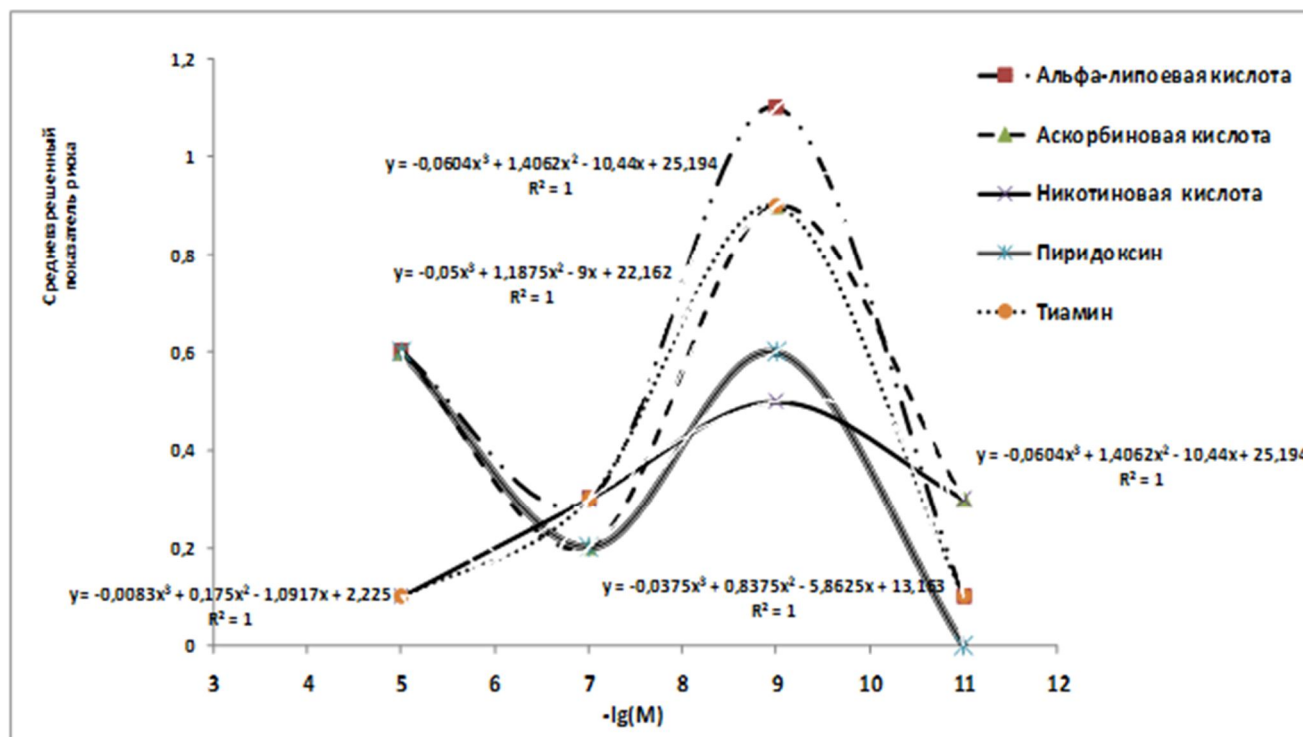


Рисунок 2.

Динамика средневзвешенного критерия риска снижения или отсутствия антиокислительного эффекта применения антиоксидантов метаболического действия в широком диапазоне концентраций (на оси абсцисс – обратный логарифм концентрации в молях, – $\lg(M)$).



При введении метаболических корректоров № 2 и № 5 установлена значимая корреляционная связь уровня величины снижения температуры, с одной стороны, и показателей АОА и Капб, с другой, (коэффициенты корреляции, соответственно, 0,73 и 0,65). Введение метаболических корректоров № 2 и № 5 сопровождалось снижением глубокой температуры тела (36,3–37,0 °С на фоне введения метаболических корректоров; 34,4–35,0 °С без коррекции) в период с 60 по 240 мин после введения ЛПС *E.coli*. Показано, что выживаемость экспериментальных животных на фоне метаболической коррекции возросла более, чем на 60 %.

Заключение

Таким образом, использование композиций АМД в исследованных дозах обеспе-

чивает функциональное резервирование молекулярных механизмов АОС в клетках организма, а также потенцирует антиокислительную и антигипоксическую эффективность пентоксифиллина при тяжелых токсико-септических состояниях, таких как ЭШ.

С помощью критериев оптимальности решения в условиях неопределенности были сформированы пять высокоэффективных метаболических корректоров. Наиболее выраженный эффект в отношении нормализации баланса про- и антиокислительных процессов, а также коррекции нарушений температурного гомеостаза организма при ЭШ, продемонстрировали два метаболических корректора:

- 1) α -липоевая кислота ($1,25 \cdot 10^{-5}$ М), тиамин ($1,5 \cdot 10^{-11}$ М), никотиновая кислота (10^{-11} М).

М), пиридоксин ($3 \cdot 10^{-5}$ М) и аскорбиновая кислота ($3 \cdot 10^{-5}$ М);

2) тиамин ($1,5 \cdot 10^{-7}$ М), аскорбиновая кислота ($3 \cdot 10^{-7}$ М), пентоксифиллин ($3,5 \cdot 10^{-5}$).

Критерии оптимальности решения в условиях неопределенности, такие как: критерий пессимизма-оптимизма Гурвица, критерий минимального риска Сэвиджа,

критерий взвешенного выигрыша, критерий среднего риска, критерий взвешенного риска могут быть успешно использованы для системного анализа эффективности многокомпонентных метаболических корректоров патологических состояний на основе использования антиоксидантов в малых дозах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Сепсис** в начале XXI века. Классификация, клинко-диагностическая концепция и лечение. Патологоанатомическая диагностика: практическое руководство / под ред. В. С. Савельева, Б. Р. Гельфанда. – М.: Литтерра, 2006. – 176 с.
2. **Давыдовский А. Г.** Свободно-радикальное окисление и антиоксидантные процессы в печени при бактериальной эндотоксемии: монография. – Минск: ООО «Ковчег», 2004. – 104 с.
3. **Bilska A., Wlodek L.** Lipoic acid – the drug of the future? // Pharmacol. Rep. – 2005. – Vol. 57, N 5. – P. 570–577.
4. **Комов В. П., Шведова В. Н.** Биохимия. – М.: Дрофа, 2006. – 638 с.
5. **Бурлакова Е. Б., Конрадов А. А., Мальцева Е. Л.** Действие сверхмалых доз биологически активных веществ и низкоинтенсивных физических факторов // Проблемы регуляции в биологических системах. Биофизические аспекты / под общей ред. А. Б. Рубина. – М.-Ижевск: НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика», Институт компьютерных исследований, 2007. – С. 390–423.
6. **Кириллов В. И.** Квалиметрия и системный анализ: учеб. пособ. – Минск : Новое знание; М.: ИНФРА-М, 2011. – 440 с.

© A. G. Davidovsky

UDC 577.112.4 + 303.732.4 + 517.977.1

SYSTEM ANALYSIS OF THE EFFECTIVENESS OF COMPOSITIONS OF ANTIOXIDANTS IN LOW DOSES FOR THE CORRECTION OF OXIDATIVE STRESS AT TOXIC-SEPTIC CONDITIONS

A. G. Davidovsky (Minsk, Belarus)

The investigation aim was to study the possibilities of choice of rational songs antioxidants metabolic action of low doses in laboratory tests in vitro, as well as assessment of their efficiency at the correction of oxidative stress in experimental modeling toxic-septic conditions in vivo, such as endotoxin shock, using the criteria of optimality of decisions under uncertainty. Metabolic correctors of antioxidant action, ensuring the normalization of prooxidative and antioxidative processes, as well as correction of violations of thermal homeostasis at bacterial endotoxin shock were characterized.

Keywords: oxidative stress, antioxidants, metabolic correction, decision-making criteria, system analysis.

REFERENCES

1. **The sepsis** in the beginning of XXI century. The classification, clinical-diagnostic concept and treatment. Pathological and anatomical diagnosis: a Practical Handbook / Ed. Century S. Savelyeva, B. R. Gelfand. – M.: Litterra, 2006. – 176 p. In Russia.
2. **Davidovsky A. G.** The free-radical oxidation and antioxidant processes in the liver at the bacterial endotoxemia: monograph. – Minsk: LLC «Ark», 2004. – 104 p. In Russia.
3. **Bilska A., Wlodek L.** Lipoic acid – the drug of the future? // Pharmacol. Rep. – 2005. – Vol. 57, N 5. – P. 570–577.
4. **Komov V. P., Shvedova V. N.** Biochemistry. – M.: Drofa, 2006. – 638 p. In Russia.
5. **Burlakova E. B., Conradov A. A., Maltseva E. L.** Action of ultra-low doses of biologically active substances and low-intensity physical factors // Problems of regulation in biological systems. Biophysical aspects / Ed. A. B. Rubin. – M.-Izhevsk: Research Center «Regular and chaotic dynamics, Institute of computer studies, 2007. – P. 390–423. In Russia.
6. **Kirillov I.** Qualimetry and system analysis: textbook. – Minsk: New knowledge; M.: INFRA-M, 2011. – 440 p. In Russia.

Davidovsky Anatoly Grigorievich – Biology PhD., Associate Professor, Department of pedagogy and education development problems, Belarusian State University.
E-mail: agd2011@list.ru

© Г. Е. Жусупова, Т. М. Шалахметова, М. К. Мурзахметова, А. В. Гадецкая, А. И. Жусупова

УДК 615.322 + 633.88 + 547.98 + 661.123

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ПРЕПАРАТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ НА ОСНОВЕ РАСТЕНИЙ КАЗАХСТАНА

Г. Е. Жусупова, Т. М. Шалахметова, М. К. Мурзахметова, А. В. Гадецкая, А. И. Жусупова
(Алматы, Республика Казахстан)

В статье показано распространение «свободнорадикальной патологии» (заболевания сердечно-сосудистой системы, желудочно-кишечного тракта, злокачественные образования), являющейся результатом уменьшения защитных возможностей организма, анализируются в сопоставительном контексте свойства препаратов синтетического и природного происхождения, используемых для устранения этой патологии. Цель статьи – охарактеризовать растительные препараты антиоксидантного действия, выделяемые на основе растений Казахстана. Отмечается, что используемые растения должны иметь промышленные запасы на территории республики, получение из них препаратов экономически и экологически выгодным, их действие должно быть по эффективности соизмеримо с мировыми аналогами, не вызывая при этом побочного действия в организме. В то время как многие антиоксидантные и гепатопротекторные препараты, применяемые в настоящее время в клинической практике, являются синтетическими, дорогостоящими, вызывают аллергические реакции и обладают выраженными кумулятивными свойствами. Поэтому в фармакотерапии и профилактике заболеваний «свободнорадикальной патологии» важное значение приобретают лекарственные средства растительного происхождения, действие которых обусловлено синергичным действием основных классов природных соединений, таких как полифенолы, аминок-, фенолокислоты, высшие карбоновые кислоты полиенового ряда, витамины, микроэлементы. В заключение делаются выводы, характеризующие предпочтительность использования в медицине природных препаратов в силу их биодоступности, малой токсичности, отсутствия аллергических и кумулятивных реакций и возможности в силу этого их длительного использования для лечения и профилактики ряда заболеваний.

Ключевые слова: растения Казахстана, антиоксидантная активность, растения рода *Limonium* Mill, кермек Гмелина (*Limonium gmelinii*), кермек тысячцветковый (*Limonium thyrianthum*) семейства свинчатковых (*Plumbagenaceae*), повилика полевая (*Cuscuta campestris* Juncker).

* Статья подготовлена по результатам работы Международной научно-практической конференции «Свободные радикалы и антиоксиданты в химии, биологии и медицине» (1-4 октября 2013 г.) в рамках реализации Программы стратегического развития ФГБОУ ВПО «Новосибирский государственный педагогический университет» на 2012–2016 гг.

Жусупова Галия Евентаевна – доктор химических наук, профессор кафедры химии и технологии органических веществ, природных соединений и полимеров, Казахский национальный университет имени аль-Фараби, факультет химии и химической технологии
E-mail: zhusupova@gmail.com

По данным Всемирной Организации Здравоохранения Республика Казахстан занимает ведущее положение среди стран Центральноазиатского региона по распространенности «свободнорадикальной патологии». В основе патогенеза этих заболеваний лежат общие фундаментальные механизмы повреждения биологических мембран тканей организма, связанные с усилением образования свободных радикалов и перекисных соединений органической и неорганической природы [1–2]. Основным субстратом свободнорадикального окисления (СРО) служат ненасыщенные липиды. Необходимым условием функционирования клетки является поддержание нормального уровня процессов СРО. При выраженном и длительном воздействии перекисного окисления липидов (ПОЛ) наблюдается снижение содержания в составе биомембран наиболее легкоокисляемых полиненасыщенных жирных кислот с одновременным увеличением концентрации жирнокислотных радикалов и вторичных продуктов ПОЛ. Повреждающее действие на клетку продуктов ПОЛ осуществляется путем образования в

липидном слое мембран гидрофильных каналов, резко нарушающих их проницаемость, инактивации энергообразующих тиоловых ферментов, разобщения окислительного фосфорилирования, что, в свою очередь, приводит к расщеплению липидов мембран, изменению липид-белковых взаимодействий и к другим необратимым последствиям.

Скорость и регуляция ПОЛ осуществляются многокомпонентной антиоксидантной (АО) системой [3], которая обеспечивает связывание и модификацию свободных радикалов, предупреждение образования и разрушения перекисей, экранирование функциональных групп белков и других биомолекул. Соотношение интенсивности процессов СРО и антиоксидантной активности определяет так называемый статус клетки, ткани и организма в целом. Процессы старения, сердечно-сосудистые, онкологические заболевания, нарушения центральной и периферической нервной системы, СПИД, диабет, артриты, катаракта, бронхиальная астма, заболевания желудочно-кишечного

Шалахметова Тамара Минажевна – доктор биологических наук, декан факультета биологии и биотехнологии, профессор кафедры биоразнообразия и биоресурсов, Казахский национальный университет имени аль-Фараби.

E-mail: Tamara.Shalakhmetova@kaznu.kz

Мурзахметова Майра Кабдрашевна – доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник, Институт физиологии человека и животных КН МОН РК.

E-mail: mairamur@mail.ru

Гадецкая Анастасия Валерьевна – PhD-докторант кафедры химии и технологии органических веществ, природных соединений и полимеров, Казахский национальный университет имени аль-Фараби, факультет химии и химической технологии.

E-mail: avg01.08@mail.ru

Жусупова Айжан Избасаровна – доктор философии (PhD), старший преподаватель кафедры молекулярной биологии и генетики факультета биологии и биотехнологии, Казахский национальный университет имени аль-Фараби.

E-mail: aizhan.zhusupova@gmail.com

тракта и другие воспалительные заболевания вызываются или сопровождаются окислительным стрессом, недостаточностью или дефектами физиологической антиоксидантной защитной системы, находящейся в состоянии неделимого единства с другими защитными системами человека – хемопротекторной и иммунной [4–6].

Для коррекции дисбаланса организма, вызванного процессами гипероксидации и приводящего к подобным патологическим состояниям, показано применение препаратов с антиоксидантной направленностью действия. В связи с этим поиск соединений с высокой АО-активностью или установление такого вида биологической активности у традиционно применяемых лекарственных средств имеет важное медицинское и общебиологическое значение. Для профилактики и комплексной терапии перекисной патологии организма используются антиоксиданты – вещества, присутствующие в системах в значительно более низких концентрациях по сравнению с окисляющимся субстратом и тормозящие его окисление [7–9].

Среди веществ, обладающих антиоксидантными, иммуностимулирующими и другими адаптогенными свойствами заметное место занимают вещества с высокой биологической активностью, выделенные из растительного сырья. При этом антиоксиданты растительного происхождения обладают комплексным действием и одновременно мягким воздействием на организм и, следовательно, низкой токсичностью, в то время как синтетические антиоксиданты могут проявлять побочные действия. Длительное употребление синтетических лекарств – чужеродных соединений приводит к активации хемопротекторных систем организма, что

имеет своим результатом специфическую и перекрестную невосприимчивость к лекарствам. Особенно наглядное представление о недостатках таких лекарств дают все без исключения цитостатики онкологической клиники. Они не только вызывают тяжелые общие токсикозы, но могут и специфически поражать сердечно-сосудистую и нервную системы, органы выделения или представляют собой мутагены и канцерогены. Настоятельная необходимость в разработке лекарств, не обладающих побочным действием, возникает также из всеобщего понимания потребности исключения ксенобиотиков из среды обитания. Совместимость растительных лекарственных средств с физиологическими антиоксидантными системами организма в силу их подобия способна целенаправленно индуцировать и мобилизовать его защитные ресурсы, что на практике реализует принцип «лечить организм, а не болезнь». Преимущество растительных лекарственных препаратов заключается в мягкости и комплексности их терапевтического действия, малой токсичности, отсутствии кумулятивного эффекта, привыкания, редком индуцировании аллергических реакций, что особенно важно в случае заболеваний, требующих длительного лечения. Они оказывают мало побочных эффектов, поскольку имеют естественную природу, действуют адресно и в большинстве случаев безопасны для человека, животных и окружающей среды.

Среди природных антиоксидантов наиболее известны растительные полифенолы в силу их потенциальных возможностей снижать риск заболеваемости и при лечении многих болезней, таких как рак, диабет, нарушения сердечно-сосудистой системы, атеросклероз, нейродегенеративные

заболевания и другие воспалительные процессы [10–13]. В первую очередь, это конденсированные дубильные вещества и флавоноиды (рис. 1).

Конденсированные дубильные вещества представляют собой димерные, олиго- и полимерные формы флаван-3-олов, последние относятся к наиболее восстановленным формам флавоноидов.

Установлено, что конденсированные танины, выделенные из наземной части *Hedysarum coronarium*, при концентрации 100 и 1000 мкг/мл ингибируют жизнедеятельность нематод (*Trichostrongylus colubriformis*), эффект действия через один месяц эксперимента составил 15 и 40 % соответственно, а с течением времени их действие еще более усиливалось. Авторы работы предполагают, что танины имеют противогельминтное действие [14]. Изучено антиоксидантное действие основных полифенольных компонентов из листьев зеленого чая: (-)-эпикатехина, (-)-эпикатехингаллата, (-)-эпигаллокатехина и галловой кислоты по отношению к перекисному окислению линолевой кислоты. Показан синергизм их антиоксидантной активности с витамином Е. При этом авторы отмечают, что антиоксидантное действие может включать захват радикалов в водной среде и регенерирование α -токоферола восстановлением α -токоферольного радикала [15]. Анализ ингибирования радикалов полифенольными соединениями чая выявляет прямую зависимость между количеством ОН-групп и антирадикальной активностью: эпигаллокатехин-3-галлат > эпикатехин-3-галлат > эпигаллокатехин > эпикатехин > катехин [16].

Исследовано влияние различных структурных факторов (+)-катехина, (-)-

эпикатехина, процианидинов, галлоильных производных как мономеров, так и димеров и формы межфлавановой связи в последних (C_4-C_8 и C_4-C_6) на их способность связываться с белками слюны (α -амилазой и пролинбогатыми белками) и альбумином из сыворотки крови крупного рогатого скота в модельном растворе.

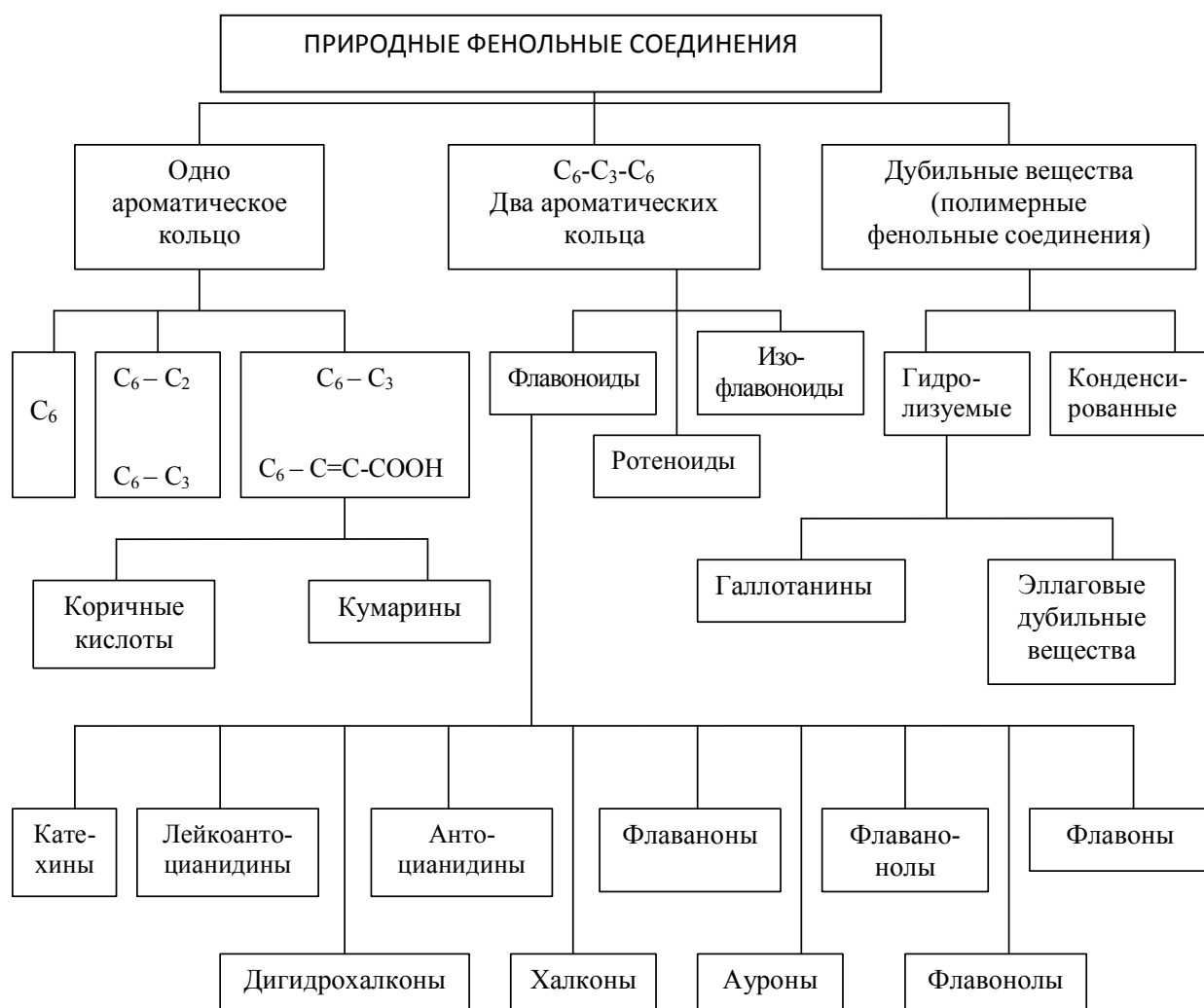
Установлено, что (+)- катехин имеет более высокую танин-специфическую активность к пролин-богатым белкам, чем (-)-эпикатехин, как и процианидины с C_4-C_8 межфлавановой связью в силу их большей конформационной подвижности по сравнению с их аналогами с C_4-C_6 связью. Этерификация же по гидроксильной группе в положении C_3 (-)-эпикатехина или эпикатехиновой группировки процианидинового димера галлоильным остатком повышает также их танин-специфическую активность. Показано ингибирующее действие конденсированных танинов на активность ксантин оксидазы, причем отмечено, что количество фенольных групп, степень полимеризации проантоцианидинов значительно влияли на силу ингибирования [17]. Проантоцианидины, как правило, представляют собой линейные молекулы, отдельные мономеры которых способны к ограниченному вращению вокруг соединяющей их связи, в результате чего молекула может приобретать относительно стабильную улиткообразную конформацию с фенольными группами, расположенными по периферии улитки. Расположение фенольных групп на «поверхности» молекулы проантоцианидинов является важным с точки зрения возможности образования многочисленных водородных связей с природными субстратами, такими как белки, что и лежит в основе их фармакологического действия. Блокируя

отдельные участки поверхности ферментов, они способны модифицировать их активность. Скрининг активности многих флаванов по отношению к ферментам предполагает, что одним из возможных механизмов действия является хелатирование ионов металлов в активном центре фермента, а также образование нерастворимых комплексов [16]. Многие микробные ферменты (целлюлазы, гликозилтрансферазы, пектиназы и другие) подавляют свою активность в присутствии танинов. Авторы полагают, что проантоцианидины действуют на внешнюю

оболочку бактерий, которая состоит из полисахаридов и белков, фиксируя ее при очень малых концентрациях. Кроме того, благодаря наличию рядовых фенольных гидроксильных групп они способны хелатировать ионы металлов, таким образом, блокируя доступ ионов металлов к микробам. Показано, что увеличение активности гидролизуемых танинов зависит от количества галлоильных или гексагидроксидифенильных групп, а конденсированных танинов от степени их полимеризации и количества фенольных групп [18].

Рисунок 1.

Классификация природных фенольных соединений



Установлено, что взаимодействие проантоцианидинов с фосфолипидами мембран клеток и лизосом ограничивает доступ окислителей к мембранам, а также предотвращает их разрушение под действием детергентов, причем гексамеры более активны [19].

Проантоцианидиновые олигомеры показали противовирусную активность против вирусов дыхательного синцития (RSV), вируса гриппа А (FLU-2) и парагриппа (PIV). Предполагается, что противовирусная активность обеспечивается прикреплением молекул танина к белковой оболочке вируса или к мембране клетки хозяина и таким образом проникновение вируса останавливается. При этом отмечена закономерность между активностью танинов и их структурой; активность конденсированных танинов увеличивалась со степенью конденсации [20].

Активное противовоспалительное действие экстрактов растения *Cistus incanus*, используемое против кожных болезней, обусловлено присутствием конденсированных танинов и проантоцианидинов [21].

Во флоре Казахстана более 100 видов растений являются лекарственными. Имеющиеся запасы подавляющего большинства этих растений при их целесообразной заготовке были бы достаточны для удовлетворения потребностей медицины Республики Казахстан, но в настоящее время промышленное значение из них имеют лишь 5 % [22-32].

Для решения этой важной государственной проблемы необходимо осуществлять отбор наиболее перспективных лекарственных видов растений с учетом их биологической активности, сырьевых

ресурсов на территории Казахстана, условий культивирования, степени сложности их заготовки и технологических процессов получения фитопрепаратов на их основе, исходя из экономической и экологической целесообразности.

В связи с прогрессирующим распространением засоленных земель и ухудшением экологической ситуации в Казахстане, с каждым годом все больше земель подвергаются опустыниванию. Особенно динамично процессам опустынивания подвержены регионы Аральского моря, северо-восточного Прикаспия и Прибалхашья и к настоящему времени деградация земель охватывает свыше 60 % территории республики. На этих почвах прекрасно приспосабливаются такие растения как лишайники, солеросы, пустынные растения, так называемые галофиты. Известно, что способность растений накапливать фенольные соединения при солевом воздействии имеет положительное значение. Их устойчивость к высоким концентрациям солей в почвах тесно связана с наличием в них соединений, проявляющих антиоксидантные свойства, и, в первую очередь, соединений полифенольной природы [33]. Именно полифенольный состав растений является одним из факторов адаптивной изменчивости растений и их приспособляемости к экстремальным условиям среды. Фенольные соединения в пределах физиологических концентраций, по-видимому, стабилизируют клеточные мембраны, а их высокая протекторная активность повышает устойчивость мембран к повреждению. Гликозиды флавонолов, по-видимому, инактивируя ферменты первичной ассимиляции азота, могут использоваться в качестве субстратов для полифенолоксидазы и пероксидазы. Свободные формы

фенольных соединений (агликоны), являющиеся менее полярными, чем их гликозиды, в пределах физиологических концентраций стабилизируют клеточные мембраны, а их высокая протекторная активность повышает устойчивость мембран к повреждению, тем самым, защищая основные клеточные компоненты от повреждающих факторов и от токсически действующих веществ [22].

К солеросам или галофитам относятся и растения рода *Limonium* (L.) Mill семейства *Plumbagenaceae* [22–32, 34]. Они привлекают к себе внимание и вызывают огромный интерес как растения, произрастающие в экстремальных условиях и издревле широко используемые в народной медицине для лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта и воспалений различного генеза. Настои и отвары кермека не вызывают повышения кровяного давления и не оказывают влияния на скорость свертывания крови. Род *Limonium* Mill в мире насчитывает около 300 видов, из них на территории стран СНГ описано 32 вида, во флоре Казахстана – 18. Два вида – *L. gmelinii* и *L. myrianthum* имеют промышленные запасы на территории РК и их производственный запас в Алматинской, Жамбылской, Атырауской, Западно-Казахстанской, Семипалатинской и Восточно-Казахстанской областях на площади свыше 160 тыс. га превышает 54,4 тыс. тонн [22, 26, 29–30, 32]. На одной территории с *L. gmelinii* и *L. myrianthum* произрастают четыре других вида – *L. leptophyllum*, *L. suffruticosum*, *L. otolepis* и *L. popovii*. *L. leptophyllum* является эндемиком, т.е. уникальным видом растения рода *Limonium* Mill, произрастающим только на территории Республики Казахстан. Никаких сведений в литературе по данному виду *Limonium* не найдено. Остальные 12 видов

(*L. leptolobum*, *L. michelsonii*, *L. chrysocomum*, *L. semenovii*, *L. reznichenkoanum*, *L. sareptanum*, *L. bungei*, *L. caspium*, *L. corraloides*, *L. macrorrhizon* и *L. sogdianum*) встречаются на территории Казахстана редко, в основном в единичных экземплярах и поэтому они не пригодны для промышленного использования.

Наиболее полную информацию по фитохимическому исследованию растений рода *Limonium* Mill дает первый том многотомного справочного издания «Растительные ресурсы СССР», опубликованный в 1985 году [34]. Однако в этот обзор не вошли данные по химическому исследованию растений видов *L. siniatum* и *L. vulgare*, опубликованные включительно по 1980 год [35–38]. С 1980 года по настоящее время вышел ряд статей по химическому исследованию растений видов *L. siniatum*, *L. caspiums*, *L. bicolor* и *L. sinence*, из них последний вид изучен наиболее глубоко [35–44]. Изученные растения и выделенные из них вещества обладают антиоксидантной, антимикробной, антивирусной и другими видами активности [35–36, 40–41, 43–44].

Одним из лекарственных растений, отличающихся высоким содержанием полифенольных соединений и их многообразием, в том числе флавоноидов, конденсированных и гидролизуемых дубильных веществ, является кермек Гмелина (*Limonium gmelinii*) семейства свинчатковых (*Plumbagenaceae*). Он относится к галофитам, произрастает во всех областях Казахстана на солончаковых землях. Размножается вегетативно и семенами, отличается быстрым ростом и высокой урожайностью, может подлежать культивированию. По проведенным расчетам запасы корней кермека будут сохранены на первоначальном уровне при заготовке до 500 кг корней в год.

Таким образом, кермек Гмелина является перспективным растением для создания лекарственных препаратов на его основе из-за широкого распространения на территории республики, что обуславливает его промышленные запасы; подходящего характера растения, связанного с его неприхотливостью, выносливостью, легкой адаптацией к окружающей среде, широкой экологической амплитудой, нормализующей содержание натриевых и кальциевых солей в почве; целесообразности заготовки, как корней, так и надземной части растения для дальнейшего его использования; простоты, экономической и экологической выгоды технологии получения субстанции «Лимонидин» из корней кермека Гмелина.

Корни кермека Гмелина, как перспективное отечественное промышленно значимое растительное лекарственное сырье, введены в Государственную Фармакопею

Республики Казахстан [45]. На их основе получают высокоэффективную субстанцию «Лимонидин» по простой, экономически и экологически целесообразной технологической схеме с высоким выходом, используя в качестве эксципиента водный раствор этилового спирта, который генерируется в процессе производства.

Субстанция представляет собой кристаллическое вещество буровато-коричневого цвета с горьковато-вяжущим вкусом, со специфическим запахом, растворимое в воде и в водных спиртовых растворах. По определению насыпной плотности, сыпучести и угла естественного откоса субстанция характеризуется низкой сыпучестью за счет сильной гигроскопичности. Дисперсность (фракционный состав) субстанции не был классифицирован, так как этот параметр задается технологически (табл. 1).

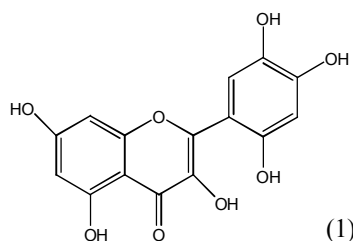
Таблица 1.

Физико-химико-технологические особенности субстанции «Лимонидин»

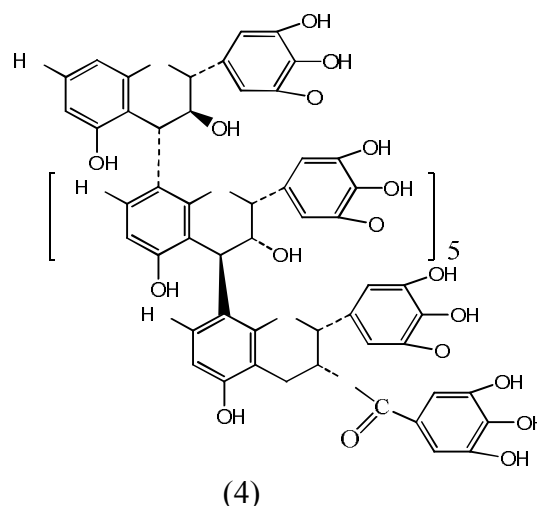
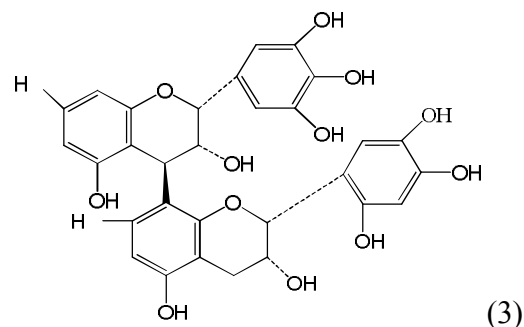
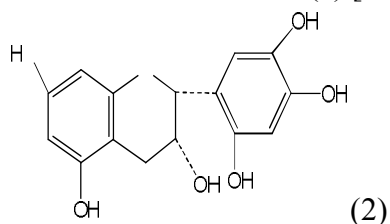
Контрольные показатели	Результаты				
Физико-химические параметры					
Цвет	буровато-коричневый с вкраплениями более темных частиц				
Вкус	горьковатый, вяжущий				
Запах	слабый специфический				
Форма частиц	анизодиаметрическая кристаллическая структура в виде пластинок, поверхность сложная, разнообразная				
Поляризуемость	к поляризации склонны лишь наимельчайшие частицы порошка				
Растворимость	растворим 30 % и 50 % в спирте этиловом, нерастворим в бензоле, хлороформе				
	Наименование растворителя	Температурные характеристики, °С			
		25	40-50	100	120
	Вода очищенная	УР	Р	ЛР	-
	Глицерин	НР	ОМР	-	ЛР
	Диметилсульфоксид	ЛР	-	-	-
	Пропиленгликоль	ЛР	-	-	-
	ПЭГ 400	НР	НР	-	-
	Масло подсолнечное	НР	НР	НР	НР
	Примечание: ЛР – легко растворим, Р – растворим, УР – умеренно растворим, ОМР – очень мало растворим, НР – нерастворим.				
Смачиваемость	Частичная				

Гигроскопичность	Гигроскопичен
Технологические параметры	
Фракционный состав, %	не классифицируется
Насыпная плотность, г/см ³	1,03±0,05
Сыпучесть, г/с	2,7±0,5
Угол естествен. откоса, °	57,7±1,3
Влажность, %	12,0 ± 2,0

При химическом исследовании корней *L. gmelinii* и субстанции «Лимонидин» идентифицированы флавонолы (мирицетин, кверцетин, изорамнетин, монометилловый эфир мирицетина и новый флавонол, ранее не описанный в литературе 3,5,7,3',4',6'-гексагидроксифлаван (1), их гликозиды (мирицитрин, рутин, 3-β-галактозилкверцетин и 3-β-галактозилмирицетин и другие



моно- и биозиды, а также впервые описанные в литературе 3-α-галактопиранозидмирицетина и 3-O-α-L-(2"-галлоил)-арабинопиранозидмирицетина), пирогаллол, галловая и эллаговая кислоты. Основным мономерным флаваном является (-)-эпигаллокатехингаллат, идентифицированы также новые, не описанные в литературе различные формы флаван-3-олов: 3,5,7,3',4',6'-гексагидроксифлаван (2), (-)-эпигаллокатехин-(4β→8)-(-)-3,5,7,3',4',6'-гексагидроксифлаван (3) и (+)-галлокатехин-(4α→8)-[(-)-эпигаллокатехин]₅-(4β→8)-(-)-эпигаллокатехингаллат (4) [46–47]:



Полифенольные соединения, легко окисляясь, в силу сопряженности окислительно-восстановительных реакций способствуют восстановлению других веществ в реакционной смеси либо препятствуют их окислению. В присутствии фенольных соединений интенсивность окисления падает, число активных продуктов медленно нарастает или остается на прежнем уровне, а весь процесс резко замедляется.

Идентифицированы также неизвестные ранее для исследуемого вида растений мировой флоры аминокислотный,

углеводородный и микроэлементный составы, витамины и ксантофиллы. Из стеролов идентифицирован наряду с известными впервые описанный 3-О-β-D-глюкопиранозид кампестерина. Витамины Е и С наряду с полифенолами представляют собой мощные антиоксиданты, используемые для лечения и профилактики многих заболеваний, в патогенезе которых идет усиление перекисного окисления липидов, связанное с изменением функциональной активности мембран.

Количество же тяжелых металлов не превышает допустимых норм для растительной субстанции, а жизненно важные макро- и микроэлементы содержатся в ней в необходимых количествах, что, по-видимому, в результате синергизма с другими важными компонентами и обуславливает широкий спектр физиологического действия полученного лекарственного средства – субстанции «Лимонидин».

Экспериментальным путем было показано, что субстанция «Лимонидин» усиливает протекание анаболических процессов в организме, направленно снижая накопление молочной кислоты (МК) в опухоли и тканях организма и смещая окислительно-восстановительный процесс в сторону образования пировиноградной кислоты (ПВК). Применение субстанции «Лимонидин» вызывало резкое снижение содержания лактата почти во всех анализируемых органах. Наибольшее уменьшение от 17,04 до 0,3 ммоль/г определено в почках, почти на 1,5 порядка меньше стало ее содержание в печени, на порядок – в опухоли и селезенке, трех и двухкратное уменьшение выявлено в легких, сердце и скелетной мышце. Анализируя отмеченные отклонения, следует отметить, что субстанция «Лимонидин» способствовала

восстановлению нормального содержания молочной кислоты в большинстве внутренних органов, наибольший эффект выявлен в паренхиматозных органах – в почках, печени и селезенке. С другой стороны, воздействие субстанции «Лимонидин» способствует повышению содержания ПВК в печени, селезенке и мышце на 30–40 %, в опухоли – на 70 %, в легких, сердце и почках – в 2–4,2 раза.

Результаты сравнительного изучения антивирусной активности субстанции (Г-6) с коммерческими средствами – Амфотерицин В, Оксолиновая мазь и Рибавирин на модели миксовирусов A/FPV/Rostock/34 и NDV(La Sota) представлены на рисунке 2.

Установлено, что субстанция «Лимонидин» обладает более высоким уровнем подавления размножения вирусов гриппа и парагриппа, чем коммерческие препараты. При этом чувствительность парамиксовируса была большей, чем ортомиксовируса. Сопоставление уровня репродукции вирусов в зависимости от концентрации лимонидина показало, что по мере ее снижения противовирусная активность препарата снижалась: при концентрации 0,025 % подавление размножения вируса гриппа составляло 80 %, а вируса болезни Ньюкасла – 60 %.

В эксперименте установлено также, что субстанция «Лимонидин» обладает значительной антимутагенной активностью, причем таковой отличаются субстанции, выделенные из корней и из надземной части растений исследуемого вида.

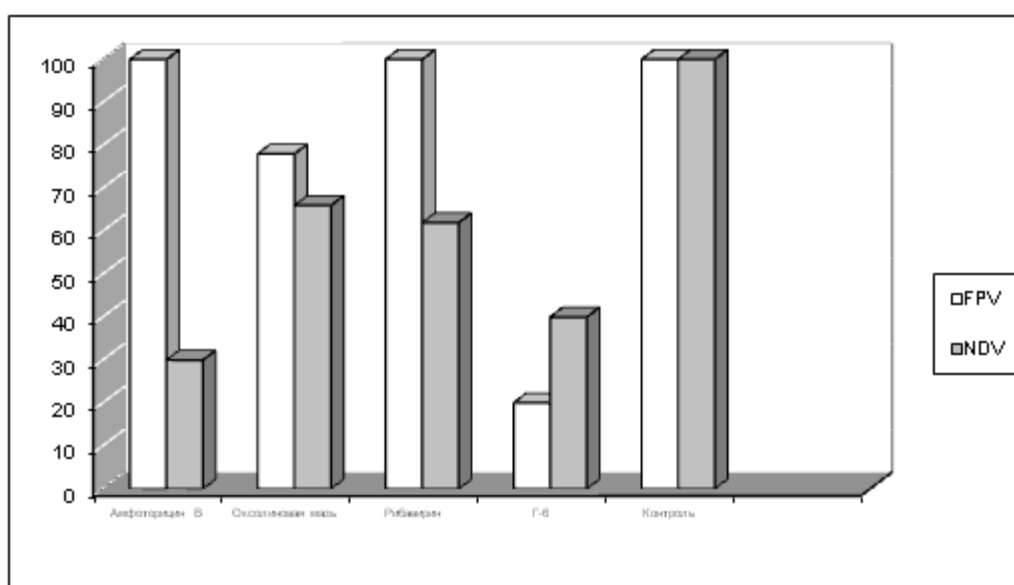
Субстанция в разных дозах была испытана на достаточном количестве лабораторных животных (белые беспородные крысы) в различных моделях острого и хронического поражения печени (отравление четыреххлористым углеродом, тяжелыми

металлами, компонентами ракетного топлива и другими ксенобиотиками) [48]. В экспериментах в качестве препарата сравнения использовался силибор – эффективное растительное гепатопротекторное средство, широко используемое в медицинской практике. Установлено, что гепатопротекторная активность исследуемой субстанции

«Лимонидин» и силибора сопоставимы, однако, терапевтическая разовая доза лимонидина в 2 раза меньше силибора. Субстанция «Лимонидин» зарегистрирована в МЗ РК (ФС РК 42-1259-08, РК-ЛС-5№008963 от 22.09.2008) и разрешена для применения в медицине.

Рисунок 2.

Влияние противовирусных препаратов на уровень репродукции микровирусов



Примечание: по оси ординат – вирусингибирующая активность (в %)

Однако при заготовке корней *L. gmelinii* вся надземная часть растений отбрасывается, что экономически и экологически не рационально и недопустимо при условии эффективности надземной части в качестве растительного источника для получения на ее основе новых, оригинальных лекарственных средств. Однако широкое практическое использование фитоантиоксидантов в качестве средств антиоксидантной терапии требует тщательного предварительного изучения их антиоксидантной эффективности как в условиях *in vitro*, так и *in vivo*.

Для доказательства биологической активности выделенной из надземной части *L. gmelinii* субстанции, последняя и субстанция из корней были протестированы на антиоксидантную активность на кафедре химии КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова с помощью модельной реакции инициированного окисления кумола, являющегося общепринятой моделью для установления аналогичного действия в растительных объектах. Показано, что по антиоксидантной активности субстанция, выделенная из надземной части, соизмерима с антиоксидантной активностью субстанции,

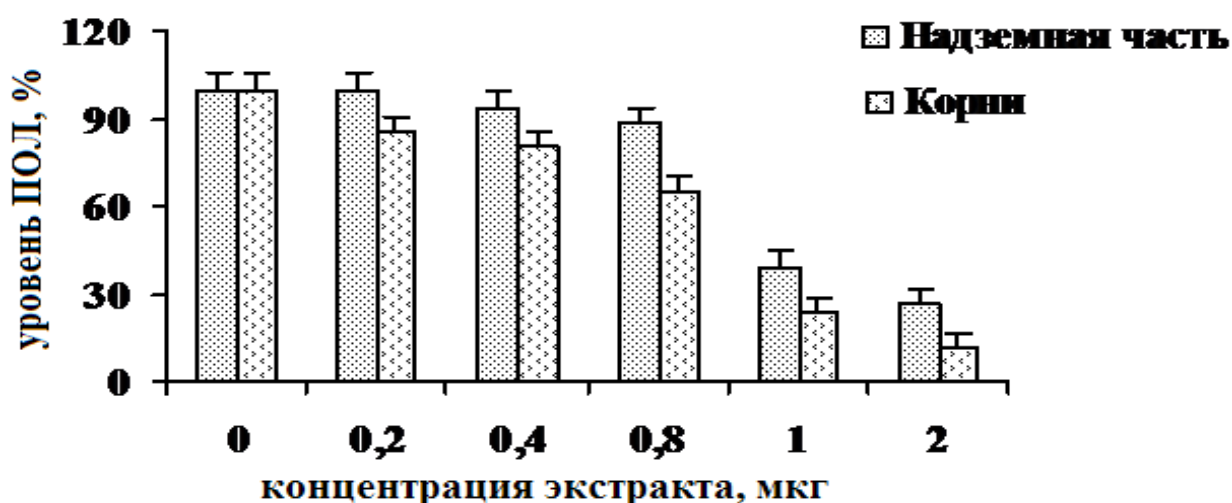
выделенной из корней этих же растений. Полученные экспериментальные данные были подтверждены исследованиями по определению антиоксидантной активности в Институте Химии университета Карачи (Пакистан). Показано, что антиоксидантная активность субстанции, выделенной из надземной части *L. gmelinii* при ее экстракции 50 % этиловым спиртом, практически одинакова с таковой для корней. Таким образом, полученные независимые данные являются важными и необходимыми, так как они свидетельствуют о соизмеримости антиоксидантной активности субстанций, выделенных из корней и надземной части растений *L. gmelinii*, и, следовательно, о возможности их совместного использования для получения на их основе растительных субстанций и других лекарственных средств.

Кроме того, были протестированы на антиоксидантную активность и другие виды данного рода растений и, в первую очередь, таковые для вида *L. myrianthum*, имеющего промышленные запасы наряду с *L. gmelinii*.

Проведенные исследования субстанций, полученных в виде сухих экстрактов из корней и надземной части растений вида *L. myrianthum*, показали наличие в них высокого содержания дубильных веществ конденсированного типа, окисленных форм флавоноидов, а также жирных кислот, аминокислот и витаминов. Синергичное действие полифенольного комплекса, выделенного экстрагированием этанолом надземной части и корней растений вида *L. myrianthum*, с витаминами (Е, Р), микроэлементами, аминокислотами (в том числе всеми незаменимыми) обуславливает проявление значительной антиоксидантной активности. Необходимо отметить, что субстанция, выделенная из корней *L. myrianthum*, проявляет больший антиоксидантный эффект, чем таковая из надземной части этого растения (рисунок 3), что коррелирует с количественными данными по содержанию в исследуемых экстрактах основных групп биологически активных веществ и прежде всего полифенолов.

Рисунок 3.

Влияние субстанции из корней и надземной части кермека тысячцветкового на уровень ПОЛ в микросомах печени крыс

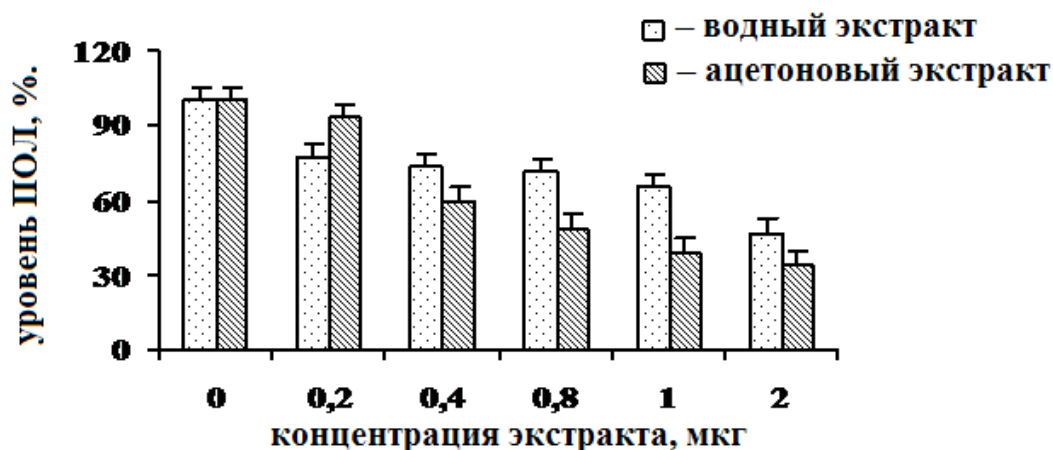


Из полученных в ходе исследования данных следует, что с увеличением концентрации полученных субстанций (от 0,2 и до 2 мкг) снижается содержание продуктов перекисного окисления липидов в микросомах печени крыс. При низких концентрациях (0,2 мкг) существенный эффект проявляет субстанция, выделенная из

корней при их экстрагировании водой, с увеличением концентрации до 0,8 мкг лучший эффект обнаруживает субстанция, полученная их экстрагированием ацетоном, а при высоких концентрациях (1 и 2 мкг) антиоксидантный эффект спиртового экстракта значительно выше, чем у водного и ацетонового (рисунок 4).

Рисунок 4.

Влияние субстанций из корней кермека тысячецветкового на уровень ПОЛ в микросомах печени крыс

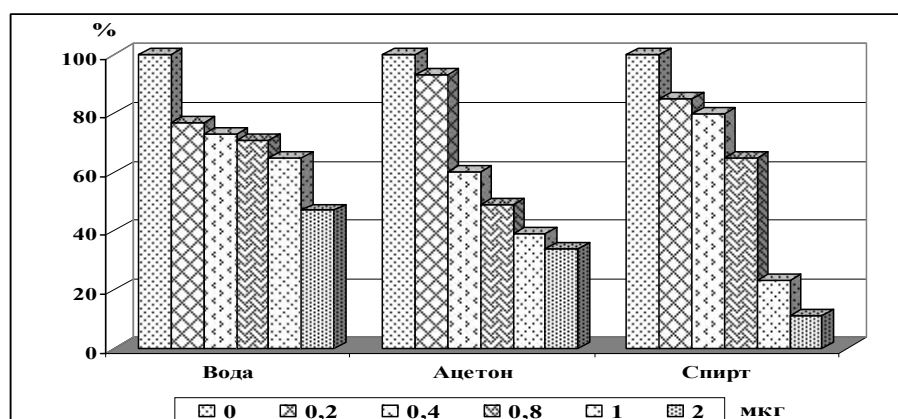


Сравнение антиоксидантной активности различных экстрактов позволило найти наиболее перспективную субстанцию для

последующего создания на ее основе различных лекарственных средств (рисунок 5).

Рисунок 5.

Сравнение эффектов разных экстракций корней кермека тысячецветкового на уровень ПОЛ в микросомах печени крыс



По оси абсцисс: растворитель; по оси ординат: уровень ПОЛ, %.

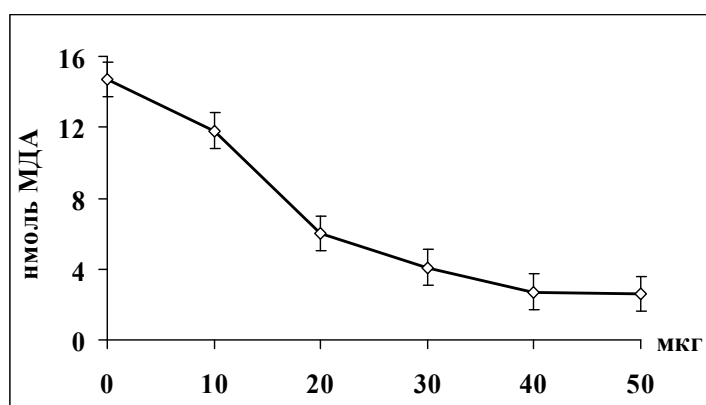
Определенный интерес представило изучение защитных свойств оказываемых повиликой полевой (*Cuscuta campestris* Juncker) против перекисного окисления липидов в микросомах печени крыс, несмотря на ее негативный эффект на сельскохозяйственные культуры в глобальном масштабе. *Cuscuta campestris* Juncker обладает характеристиками, которые могут быть использованы в борьбе с различными патологиями в организме человека, что ранее было продемонстрировано данными народной медицины на других видах повилик, в частности, на *Cuscuta chinensis* Lam. и *Cuscuta europaea* L. [49]. Высушенные образцы повилики полевой были измельчены до конечного размера 1–3 мм. При их экстрагировании 50 % этиловым спиртом и диметилсульфоксидом (ДМСО) были получены из исследуемых образцов субстанции, выделенные в виде жидких экстрактов. ПОЛ индуцировали в течение 60

минут системой Fe²⁺/аскорбат. Экстракты повилики полевой предварительно инкубировались с МПК в течение 15 минут при 37 °С. Экстракты не влияют на накопление ТБКРС без индукции ПОЛ. Значительное снижение ТБКРС наблюдается в присутствии экстрактов ДМСО в сравнении с этанольными экстрактами при концентрации 20 мкг экстракта/ мг белка (3,3 и 6,3 ммоль, соответственно, для ДМСО и этанольных экстрактов), что, вероятно, связано с более тщательной экстракцией фракции фенольных соединений ДМСО.

Результаты исследования спиртового экстракта повилики на уровень продуктов перекисного окисления липидов в микросомах печени крыс выявило, что экстракт повилики снижает образование перекисных продуктов в зависимости от дозы (рисунок 6). При концентрации экстракта 40 мкг/мг белка и выше практически полностью подавляется образование перекисных продуктов в микросомах печени крыс.

Рисунок 6.

Влияние спиртового экстракта повилики на уровень ПОЛ в микросомах печени крыс



Сравнительное изучение защитных свойств исследуемых экстрактов с таковыми для α-токоферола показали, что их эффективность против ПОЛ в МПК

практически однозначна. Таким образом, проведенное исследование показало, что как экстракты ДМСО, так и этанольные, могут быть использованы для ингибирования

процессов ПОЛ в МПК и что эффективность их защиты сопоставима с таковой для α -токоферола, общепризнанного антиоксиданта, присутствующего в организме человека.

Методология

В эксперименте с CCl_4 в качестве аналога для сравнения активности Лимонидина был использован фитопрепарат силибор.

Введение крысам определённых доз Лимонидина и силибора в водных растворах проводилось однократно, внутривентрикулярно через зонд за 1 час до применения гепатотоксина – четырёххлористого углерода (CCl_4) в течение дней. Забой животных проводили под нембауловым наркозом в одно и тоже время (9-10 часов утра). Содержание малонового диальдегида (МДА) и гидроперекисей липидов (ГПЛ), а также активность ферментов определяли в гомогенате печени крыс. Предклинические испытания проводили на белых беспородных

крысах-самцах с массой тела 220-250 г, разделенных на 4 группы (по 10 животных):

I – интактные животные (контроль),

II – животные получали 5 мг/кг CCl_4 (50% раствор на оливковом масле) однократно, внутривентрикулярно;

III – животные получали 100 мг/кг Лимонидина и 5 мг/кг CCl_4 однократно, внутривентрикулярно;

IV – животные получали 200 мг/кг силибора и 5 мг/кг CCl_4 в тех же условиях.

Интоксикация животных CCl_4 вызывает активацию процессов ПОЛ, т.е. увеличение содержания МДА и GPL и подавление антиокислительных процессов за счет снижения активности ферментов – супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы. В таблице 2 представлены результаты биохимических исследований крыс контрольной и экспериментальных групп при их интоксикации CCl_4 и сочетанном использовании CCl_4 и фитопрепаратов.

Таблица 2.

Содержание GPL, МДА и активность СОД, каталазы в печени крыс

Группа	Условия опыта	GPL (усл.ед/г)	МДА (мм/г)	СОД (усл.ед/г)	Каталаза (усл.ед/г)
I	Контроль	$23,9 \pm 0,6$	$1,9 \pm 0,1$	$147,2 \pm 3,2$	$302,2 \pm 8,4$
II	CCl_4	$37,9 \pm 0,3$	$4,2 \pm 0,1$	$21,5 \pm 4,6$	$162,7 \pm 4,2$
III	CCl_4 + Лимонидин (100 мг/кг)	$29,2 \pm 4,1$	$2,5 \pm 0,2$	$119,2 \pm 2,8$	$175,4 \pm 1,5$
IV	CCl_4 +силибор (200 мг/кг)	$28,6 \pm 2,8$	$2,7 \pm 0,1$	$122,3 \pm 2,2$	$172,5 \pm 3,0$

Как показали результаты, приведенные в таблице 2, при введении животным гепатотоксина CCl_4 происходит активация ПОЛ – содержание МДА и GPL увеличивается в 2,2 и 1,6 раза и подавление антиокислительных процессов за счет снижения активности ферментов – СОД и каталазы в 7,0 и 1,8 раза соответственно.

Процессы ПОЛ, индуцированные CCl_4 , в значительной степени снижаются при одновременном приеме Лимонидина (III группа). Об этом свидетельствовало уменьшение содержания первичных и вторичных продуктов ПОЛ (содержание МДА и GPL снижается в 1,4–1,7 и 1,3–1,4 раза), а также повышение активности

ферментов антиоксидантной защиты у этих животных: активность СОД и каталазы повышается в 5,5–5,7 и 1,2 раза соответственно по сравнению с крысами, получавшими только CCl_4 . Несмотря на то, что показатели ПОЛ при приёме Лимонидина у интоксигированных крыс полностью не нормализовались, тяжесть структурных повреждений в печени этих животных была значительно меньше. Так, результаты морфологических исследований показали, что однократное внутривенное введение CCl_4 крысам приводило к развитию острого токсического гепатита, значительной гибели центробулярных гепатоцитов. Сочетанное действие фитопрепарата с CCl_4 значительно уменьшало степень деструктивных процессов, вызванных CCl_4 . Аналогичная тенденция в снижении содержания продуктов ПОЛ и повышении активности антиокислительных ферментов наблюдалась и в группе сравнения (IV), где наряду с CCl_4 применялся гепатопротектор силибор. Показано, что Лимонидин в дозе 100 мг/кг обладает выраженным антиоксидантным и гепатопротекторным действием и его эффект сопоставим с действием силибора (доза – 200 мг/кг), применяемым в медицинской практике.

Кроме того, эксперименты проведены на животных при их отравлении тяжелыми металлами, компонентами ракетного топлива и другими ксенобиотиками. В комплексных исследованиях с помощью различных методов (гистологического, морфометрического, количественного цитохимического и биохимического) было установлено, что субстанция «Лимонидин» повышает устойчивость печени к патологическим воздействиям, усиливает её обезвреживающую функцию путём

повышения активности ферментных систем монооксигеназной системы, а также способствует восстановлению структуры при различных повреждениях.

Для выделения микросомальной фракции навеску (0,5–1,0 г) ткани печени крыс после промывания в охлажденном физиологическом растворе помещали в 10 мл среды, содержащей 0,85 % NaCl и 50мМ KH_2PO_4 , (рН 7,4 при 4°C) и гомогенизировали гомогенизатором типа Polytron в течение 90 сек. Гомогенат центрифугировали при 10000g в течение 20 мин. Микросомную фракцию получали, центрифугируя супернатант при 30000g в течение 60 мин. Надосадочную жидкость осторожно сливали и осадок, представляющий собой фракцию тяжелых микросом, суспендировали в среде, содержащей 25 % глицерина, 0.1 мМ ЭДТА, 0.2 мМ CaCl_2 , 10 мМ гистидина, (рН 7.2 при 4°C) и хранили при минус 4°C [50].

Для индукции процесса перекисного окисления липидов (ПОЛ) в мембранах используют систему Fe^{2+} +аскорбат. Содержание малонового диальдегида (МДА), продуктов ПОЛ определяют в реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой по интенсивности развивающейся окраски. Расчет содержания продуктов, реагирующих с ТБК, проведена с учетом коэффициента молярной экстинкции МДА, равного $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [51].

Эритроциты получены центрифугированием крови в течение 10 мин при 1000g. Плазма и клетки белой крови удаляют, а эритроциты дважды промывают средой, содержащей 150 мМ NaCl , 5 мМ Na_2HPO_4 (рН-7,4).

Осмотическая резистентность эритроцитов определена по степени гемолиза в

гипотонических растворах NaCl (0,35–0,5 г/100мл).

Заключение

Выбор данного направления исследований обусловлен поиском растений Казахстана, содержащих комплекс синергично действующих биологически активных веществ растительного происхождения,

влияющих на продолжительность жизни и сохранение здоровья путем повышения физиологических возможностей организма человека и животных. Под этим подразумевается сохранение резервных сил и адаптационных механизмов, а также стимулирование физиологических способностей организма при приспособлении к меняющимся условиям жизни.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Droge W.** Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function // *Physiol. Rev.* – 2002. – Vol. 82, – N 1. – P. 47–95.
2. **Kehrer J. P., Robertson J. D. and Smith C. V.** Free Radicals and Reactive Oxygen Species // *Comprehensive Toxicology.* – 2010. – Vol.1. – P. 277–307.
3. **Halliwel B.** Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life // *Plant. Physiology.* – 2006. – Vol.141. – P. 312–322.
4. **Halliwel B.** Antioxidants in human health and disease // *Annu.Rev.Nutr.* – 1996. – Vol.16. – P. 33–50.
5. **Valko M., Leibfritz D., Moncola J., Cronin M. T. D., Mazur M., Telser J.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* – 2007. – Vol. 39. – P. 44–84.
6. **Storz P.** Reactive oxygen species in tumor progression // *Front. Biosci.* – 2005. – Vol.10. – P. 1881–1896.
7. **Rice-Evans C. A., Diplock A. T.** Current status of antioxidant therapy // *Free Radic.Biol.Med.* – 1993. – Vol.15. – N 1. – P.77–96.
8. **Sies H.** Oxidative stress: Oxidants and antioxidants // *Exp. Physiol.* – 1997. – Vol. 82, – N 2. – P. 291–295.
9. **Cuzzocrea S., Thiemermann C., Salvemini D.** Potential therapeutic effect of antioxidant therapy in shock and inflammation // *Curr.Med.Chem.* – 2004. – Vol. 11. – P. 1147–1162.
10. **Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C. and Jiménez L.** Polyphenols: food sources and bioavailability // *Am. J. Clin.Nutrition.* – 2004. – Vol. 79. – N 5. – P. 727–747.
11. **Boudet A. M.** Evolution and current status of research in phenolic compounds // *Phytochemistry.* – 2007. – Vol. 68. – N 22–24. – P. 2722–2735.
12. **Manach C., Mazur A., Scalbert A.** Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases // *Curr. Opin. Lipidol.* – 2005. – Vol.16. – N 1. – P.77–84.
13. **Arts I. C., Hollman P. Ch.** Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies // *Am J Clin Nutr.* – 2005. – Vol. 81. – N 1. – P. 317S–325S.
14. **Molan A. L., Waghorn G. C, Min B. R., McNabb W. C.** The effect of condensed tannins from seven herbages on *Trichostrongylus colubriformis* larval migration in vitro // *Folia Parasitol.* – 2000. – Vol. 47. – № 1. – P. 39–44.
15. **Bo Z., Zhi-Sheng J., Zhi-Hua C., Li Y., Long-Min W., Zhong-Li L.** Synergetic antioxidant effect of green tea polyphenols with α -tocopherol on the radical induced peroxidation of linoleic acid in micelles // *J. Chem. Soc.* – 2000. – Vol. 4. – P. 785–791.

16. **Lin J.-K., Liang Y.-C.** Cancer chemoprevention by tea polyphenols // *Proc. Natl. Sci. Coun.* – 2000. – Vol. 24. – P. 1–13.
17. **De Freitas V., Mateus N.** Structural features of procyanidin interactions with salivary proteins // *J. Agr. and Food Chem.* – 2001. – Vol. 49. – № 2. – P. 940–945.
18. **Scalbert A.** Antimicrobial properties of tannins // *Phytochem.* – 1991. – Vol. 30. – № 12. – P. 3875–3883.
19. **Verstraeten S. V., Keen C. L., Schmitz H. H., Fraga C. G. and Oteiza P. I.** Flavan-3-ols and procianidins protect liposomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure // *Free Radic. Biol. Med.* – 2003. – Vol. 34, № 1. – P. 84–92.
20. **Nagai T., Miyachi Y., Tomimori T., Yamada H.** Inhibition of influenza virus sialidase and anti-influenza virus activity by plant flavonoids // *Chem. Pharm. Bull.* – 1990. – Vol. 5. – № 38. – P. 1329–1332.
21. **Petereit F., Kolodziej H., Nahrsted A.** Flavan-3-ols and proanthocyanidins from *Cistus incanus* // *Phytochem.* – 1991. – Vol. 30. – N 3. – P. 981–985.
22. **Лекарственные растения Казахстана и их использование.** – Алматы: Ғылым, 1996. – 344 с.
23. **Флора СССР.** – М.: АН СССР, 1952. – Т. XVIII. – С. 411–467.
24. **Флора Казахстана.** – Алма-Ата: Наука, 1961. – Т. VII. – С. 79–80.
25. **Атлас ареалов и ресурсов лекарственных растений Казахстана.** – Алматы: Ғылым, 1994. – С. 41.
26. **Кукенов М. К.** Ботаническое ресурсосведение Казахстана. – Алматы: Ғылым, 1999. – 160 с.
27. **Сиверцев И. И., Абакумова Л. Ф.** Фармакологическое изучение и лечебное применение препаратов кермека // *Изв. АН Каз ССР. Серия физиолог.* – 1950. – Вып. 3. – С. 75–88.
28. **Клышев Л. К., Алюкина Л. С.** Материалы к вопросу изучения дубильных промышленных видов кермека (*Statice gmelinii* Wild. *Statice myrianthum* Schrenk) // *Вестн. АН КазССР.* – 1951. – № 5. – С. 99–104.
29. **Павлов Н. В.** Растительное сырье Казахстана. – М., Л.: АН СССР, 1947. – 552 с.
30. **Михайлова В. П.** Дубильные растения флоры Казахстана и их освоение. – Алма-Ата: Наука, 1968. – 326 с.
31. **Алюкина Л. С.** Флавоноидоносные и танидоносные растения Казахстана. – Алма-Ата: Наука, 1977. – 152 с.
32. **Чумбалов Т. К.** Химическое исследование дубильных и сопутствующих им веществ некоторых растений Казахстана: автореф. ... д-ра хим. наук. – Ташкент, 1966. – 26 с.
33. **Достанова Р. Х.** Фенольный комплекс растений при засолении среды: автореф. ... д-ра биол. наук. – Новосибирск, 1994. – 34 с.
34. **Растительные ресурсы СССР.** – Л.: Наука, 1985. – Т. 1. – С. 293–297.
35. **Asen S., Plimmer J. R.** 4,6,4'-trihydroxyaurone and other flavonoids from *Limonium* // *Phytochem.* – 1972. – Vol. 11. – P. 2601–2603.
36. **Larher F., Hamelin J.** L'acide β -triméthylaminopropionique les rameaux de *Limonium Vulgare* Mill // *Phytochem.* – 1975. – Vol. 14. – N 1. – P. 205–207.
37. **Larher F., Hamelin J.** Mise en evidence de L'acide 2-triméthylamino-6-cetoheptanoïque dans les rameaux de *Limonium Vulgare* // *Phytochem.* – 1975. – Vol. 14, № 8. – P. 1789–1791.
38. **Ross S. A., El-Sayyad S. M.** Flavonoids from the leaves of *Limonium siniatum* grown in Egypt // *Planta Med.* – 1980. – Vol. 39. – № 2. – P. 187–189.

39. **Ross S. A.** Myricetin-3'-methyl ether-7-glucoside from *Limonium sinuatum* // *J. Natur. Prod.* – 1984. – Vol. 47. – P. 862–864.
40. **Lin L. C., Kuo Y. C., Chou C. J.** Anti-herpes simplex virus type-1 flavonoids and new flavone from the root of *Limonium sinense* // *Planta Med.* – 2000. – Vol. 66. – P. 333–336.
41. **Lin L. C., Chou C. J.** Flavonoids and phenolics from *Limonium sinense* // *Planta Med.* – 2000. – Vol. 66. – P. 382–383.
42. **Мовсумов И. С.** Флавоноиды корней *Limonium caspium* // *Химия природных соединений.* – 1996. – № 6. – С. 948.
43. **Zhang L.-R., Zou G.-L.** Flavanol of *Limonium bicolor* // *Химия природных соединений.* – 2004. – № 6. – С. 495.
44. **Harborne J. B.** Comparative biochemistry of the flavonoids–IV. Correlation between chemistry, pollen morphology and systematics in the family Plumbaginaceae // *Phytochem.* – 1967. – Vol. 6. – P. 1415–1428.
45. **Жусупова Г. Е.** Кермека Гмелина корневища и корни. Государственная фармакопея Республики Казахстан. – Алматы : Издательский дом «Жибек жолы», 2009. – Т.2. – С. 706–707.
46. **Zhusupova G. E., Abilkaeva S. A.** Dimeric prodelphinidins from *Limonium gmelinii* roots. III // *Chemistry of Natural Compounds.* – 2006. – № 2. – С. 134–138. <http://dx.doi.org/10.1007/s10600-006-0068-8>.
47. **Zhanar A., Kozhamkulova, Galiya E., Zhusupova, Zharilkasin A., Abilov, Mohamed M. Radwan, Samir A. Ross.** A New Flavonol Glycoside from *Limonium gmelinii* // *Planta medica.* – 2010. – P. 534–535.
48. **Венгеровский А. И., Саратиков А. С.** Механизм действия гепатопротекторов при токсических поражениях печени / *Фармакология и токсикология*, 1988. – № 1. – С. 89.
49. **Kala C. P., Farooquee N. A., Dhar U.** Prioritization of medicinal plants on the basis of available knowledge, existing practices and use value status in Uttaranchal, India // *Biodiver. Conserv.* – 2004. – Vol. 13. – No. 2. – P. 453–469.
50. **Горгошидзе Л. Ш., Конь И. Я., Кулаков С. Н., Шевяков А. Н.** Перекисное окисление липидов в печени крыс при нетяжёлых формах недостаточности витамина А // *Вопросы питания.* – 1986. – Т. 5. – С. 45–51.
51. **Ohkawa H. O., Ohishi N., Yagi K.** Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction // *Anal. Biochem.* – 1979. – Vol. 95. – N. 2. – P. 351–358.

© G. E. Zhusupova, T. M. Shalakhmetova, M. K. Murzakhmetova, A. V. Gadetskaya, A. I. Zhusupova

UDC 615.322 + 633.88 + 547.98 + 661.123

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF SOME PREPARATIONS, OBTAINED ON THE BASIS OF KAZAKHSTANI PLANTS

G. E. Zhusupova, T. M. Shalakhmetova, M. K. Murzakhmetova, A. V. Gadetskaya, A. I. Zhusupova
(Almaty, Republic of Kazakhstan)

The paper shows the distribution of "free radical pathology" (diseases of the cardiovascular system, gastrointestinal tract, malignancy), which is the result of reducing the protective capacity of the organism; comparative analysis of some features of preparations of synthetic and natural origin, used for the elimination of this disease, is given. Aim of the article – is to characterize the antioxidant effect of herbal preparations, obtained on the basis of Kazakhstani plants. It is noted that the stocks of used plants have recoverable reserves in the country, obtaining preparations on their basis is economically and environmentally beneficial, and most important is that their action must be commensurate with the efficiency of global analogues, without causing side effects in the body. While many antioxidant and hepatoprotective drugs currently used in clinical practice are synthetic, costly, cause allergic reactions and possess pronounced cumulative properties. Therefore, in pharmacotherapy and disease prevention of "free radical pathology", herbal medicinal products become important, the effect of which is based on a synergistic action of the major classes of natural compounds, such as polyphenols, amino and phenolic acids, higher carboxylic acids of polyene series, vitamins and microelements. Finally, conclusions are drawn, which characterize the preferred use of natural preparations in medicine in view of their bioavailability, low toxicity, absence of allergic and cumulative reactions, and by virtue of this, the possibility of their prolonged use in the treatment and prevention of several diseases.

Key words: Kazakhstani plants, antioxidant activity, plants of *Limonium* Mill genus, *Limonium gmelinii*, *Limonium. myrianthum* of *Plumbageneae* family, *Cuscuta campestris* Juncker.

REFERENCES

1. **Droge W.** Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function // *Physiol. Rev.* – 2002. – Vol. 82, – N 1. – P. 47–95.
2. **Kehrer J. P., Robertson J. D. and Smith C. V.** Free Radicals and Reactive Oxygen Species // *Comprehensive Toxicology.* – 2010. – Vol.1. – P. 277–307.
3. **Halliwell B.** Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life // *Plant. Physiology.* – 2006. – Vol.141. – P. 312–322.
4. **Halliwell B.** Antioxidants in human health and disease // *Annu.Rev.Nutr.* – 1996. – Vol.16. – P. 33–50.
5. **Valko M., Leibfritz D., Moncola J., Cronin M. T. D., Mazur M., Telser J.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* – 2007. – Vol. 39. – P. 44–84.
6. **Storz P.** Reactive oxygen species in tumor progression // *Front. Biosci.* – 2005. – Vol.10. – P. 1881–1896.

7. **Rice-Evans C. A., Diplock A. T.** Current status of antioxidant therapy // *Free Radic.Biol.Med.* – 1993. – Vol.15. – N 1. – P.77–96.
8. **Sies H.** Oxidative stress: Oxidants and antioxidants // *Exp. Physiol.* – 1997. – Vol. 82, – N 2. – P. 291–295.
9. **Cuzzocrea S., Thiemermann C., Salvemini D.** Potential therapeutic effect of antioxidant therapy in shock and inflammation // *Curr.Med.Chem.* – 2004. – Vol. 11. – P. 1147–1162.
10. **Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C. and Jiménez L.** Polyphenols: food sources and bioavailability // *Am. J. Clin.Nutrition.* – 2004. – Vol. 79. – N 5. – P. 727–747.
11. **Boudet A. M.** Evolution and current status of research in phenolic compounds // *Phytochemistry.* – 2007. – Vol. 68. – N 22–24. – P. 2722–2735.
12. **Manach C., Mazur A., Scalbert A.** Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases // *Curr. Opin. Lipidol.* – 2005. – Vol.16. – N 1. – P.77–84.
13. **Arts I. C., Hollman P. Ch.** Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies // *Am J Clin Nutr.* – 2005. – Vol. 81. – N 1. – P. 317S–325S.
14. **Molan A. L., Waghorn G. C, Min B. R., McNabb W. C.** The effect of condensed tannins from seven herbage on *Trichostrongylus colubriformis* larval migration in vitro // *Folia Parasitol.* – 2000. – Vol. 47. – № 1. – P. 39–44.
15. **Bo Z., Zhi-Sheng J., Zhi-Hua C., Li Y., Long-Min W., Zhong-Li L.** Synergetic antioxidant effect of green tea polyphenols with 0-tocopherol on the radical induced peroxidation of linoleic acid in micelles // *J. Chem. Soc.* – 2000. – Vol. 4. – P. 785–791.
16. **Lin J.-K., Liang Y.-C.** Cancer chemoprevention by tea polyphenols // *Proc. Natl. Sci. Coun.* – 2000. – Vol. 24. – P. 1–13.
17. **De Freitas V., Mateus N.** Structural features of procyanidin interactions with salivary proteins // *J. Agr. and Food Chem.* – 2001. – Vol. 49. – № 2. – P. 940–945.
18. **Scalbert A.** Antimicrobial properties of tannins // *Phytochem.* – 1991. – Vol. 30. – № 12. – P. 3875–3883.
19. **Verstraeten S. V., Keen C. L., Schmitz H. H., Fraga C. G. and Oteiza P. I.** Flavan-3-ols and procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure // *Free Radic. Biol. Med.* – 2003. – Vol. 34, № 1. – P. 84–92.
20. **Nagai T., Miyachi Y., Tomimori T., Yamada H.** Inhibition of influenza virus sialidase and anti-influenza virus activity by plant flavonoids // *Chem. Pharm. Bull.* – 1990. – Vol. 5. – № 38. – P. 1329–1332.
21. **Petereit F., Kolodziej H., Nahrsted A.** Flavan-3-ols and proanthocyanidins from *Cistus incanus* // *Phytochem.* – 1991. – Vol. 30. – N 3. – P. 981–985.
22. **Herbs of Kazakhstan and their use.** – Almaty, 1996. – 344 p.
23. **Flora of the USSR.** – M., 1952. – XVIII. – pp. 411–467.
24. **Flora of Kazakhstan.** – Alma-Ata: the Science, 1961. – VII. – pp. 79–80.
25. **The Atlas of areas and resources of herbs of Kazakhstan.** – Almaty, 1994. – p. 41.
26. **Kukenov M. K.** Botanical resources of Kazakhstan. – Almaty, 1999. – 160 p.
27. **Sivertsev I. I., Abakumov L. F.** Pharmacological studying and medical application of kermek preparations // *News of Kazakhstan academy of sciences. A series the physiologist.* – 1950. – Vol. 3. – pp. 75–88.
28. **Klyshev L. K., Alyukina L. S.** Materials to a question of studying of tannic industrial kinds of kermek (*Statice gmelinii* Wild. *Statice myrianthum* Schrenk) // *News of Kazakhstan academy of sciences.* – 1951. – №5. – pp. 99–104.
29. **Pavlov N. V.** Vegetative raw material of Kazakhstan. – M, 1947. – 552 p.

30. **Mihailova V. P.** Tannic of a plant of flora of Kazakhstan and their development. – Alma-Ata: the Science, 1968. – 326 p.
31. **Alyukina L. S.** Flavonoid and tanid plants of Kazakhstan. – Alma-Ata: the Science, 1977. – 152 p.
32. **Chumbalov T. K.** Chemical research of substances of some plants of Kazakhstan tannic and accompanying them. – Tashkent, 1966. – 26 p.
33. **Dostanova R. H.** Phenol complex of plants at salt of environments. – Novosibirsk, 1994. – 34 p.
34. **Vegetative** resources of the USSR. – L.: the Science, 1985. - vol.1. – pp. 293–297
35. **Asen S., Plimmer J. R.** 4,6,4'-trihydroxyaurone and other flavonoids from Limonium // Phytochem. – 1972. – Vol. 11. – P. 2601–2603.
36. **Larher F., Hamelin J.** L'acide β -trimethylamminopropionique les rameaux de Limonium Vulgare Mill // Phytochem. – 1975. – Vol. 14. – N 1. – P. 205–207.
37. **Larher F., Hamelin J.** Mise en evidence de L'acide 2-trimethylamino-6-cetoheptanoique dans les rameaux de Limonium Vulgare // Phytochem. – 1975. – Vol. 14, № 8. – P. 1789–1791.
38. **Ross S. A., El-Sayyad S. M.** Flavonoids from the leaves of Limonium siniatum grown in Egypt // Planta Med. – 1980. – Vol. 39. – № 2. – P. 187–189.
39. **Ross S. A.** Myricetin-3'-methyl ether-7-glucoside from Limonium sinuatum // J. Natur. Prod. – 1984. – Vol. 47. – P. 862–864.
40. **Lin L. C., Kuo Y. C., Chou C. J.** Anti-herpes simplex virus type-1 flavonoids and new flavone from the root of Limonium sinense // Planta Med. – 2000. – Vol. 66. – P. 333–336.
41. **Lin L. C., Chou C. J.** Flavonoids and phenolics from Limonium sinense // Planta Med. – 2000. – Vol. 66. – P. 382–383.
42. **Movsumov I. S.** Flavonoids of roots Limonium caspium // Chemistry of natural connections. – 1996. – 6. – p. 948.
43. **Zhang L.-R., Zou G.-L.** Flavanol of Limonium bicolor // Химия природных соединений. – 2004. – № 6. – С. 495.
44. **Harborne J. B.** Comparative biochemistry of the flavonoids–IV. Correlation between chemistry, pollen morphology and systematics in the family Plumbaginaceae // Phytochem. – 1967. – Vol. 6. – P. 1415–1428.
45. **Zhusupova G. E.** Kermeka Gmelina rhizomes and roots. The state pharmacopoeia of Republic Kazakhstan. – Almaty, 2009. – Vol. 2. – pp. 706–707.
46. **Zhusupova G. E., Abilkaeva S. A.** Dimeric prodelphinidins from Limonium gmelinii roots. III // Chemistry of Natural Compounds. – 2006. – № 2. – С. 134–138. <http://dx.doi.org/10.1007/s10600-006-0068-8>.
47. **Zhanar A., Kozhamkulova, Galiya E., Zhusupova, Zharilkasin A., Abilov, Mohamed M. Radwan, Samir A. Ross.** A New Flavonol Glycoside from Limonium gmelinii // Planta medica. – 2010. – P. 534–535.
48. **Vengerovskij A. I., Saratkov A. S.** Mechanism of action of hepatoprotektors at toxic defeats of a liver / Pharmacology and toxicology, 1988. – N 1. –p. 89.
49. **Kala C. P., Farooquee N. A., Dhar U.** Prioritization of medicinal plants on the basis of available knowledge, existing practices and use value status in Uttaranchal, India // Biodiver. Conserv. – 2004. – Vol. 13. – No. 2. – P. 453–469.
50. **Gorgoshidze L. S., Kon I. J., Kulakov S. N., Shevyakov A. N.** Peroxide oxidation of lipids in a liver of rats at not heavy forms of insufficiency of vitamin A // Questions of a feed, 1986. – vol. 5. – pp. 45–51.

51. **Ohkawa H. O., Ohishi N., Yagi K.** Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction // Anal. Biochem. – 1979. – Vol. 95. – N 2. – P. 351–358.

Galiya E. Zhusupova – Doctor of chemistry, Professor, Department of Chemistry and Technology of Organic Substances, Natural Compounds and Polymers, School of Chemistry and Chemical Technology, al-Farabi Kazakh National University

E-mail: zhusupova@gmail.com

Tamara M. Shalakhmetova – Doctor of biology, Dean, School of Biology and Biotechnology, Professor, Department of Biological diversity and Bioresources, al-Farabi Kazakh National University.

E-mail: Tamara.Shalakhmetova@kaznu.kz

Maira K. Murzakhmetova – Doctor of biology, Professor, Chief Scientist, Institute of Human and Animal Physiology.

E-mail: mairamur@mail.ru

Anastasiya V. Gadetskaya – 2-nd year PhD student, Department of Chemistry and Technology of Organic Substances, Natural Compounds and Polymers, School of Chemistry and Chemical Technology, al-Farabi Kazakh National University.

E-mail: avg01.08@mail.ru

Aizhan I. Zhusupova – PhD, Assistant Professor, Department of Molecular Biology and Genetics, School of Biology and Biotechnology, al-Farabi Kazakh National University.

E-mail: aizhan.zhusupova@gmail.com

© У. К. Ибрагимов

УДК 616.052 + 616.003

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТА АНТИОКСИДАНТА И АНТИГИПОКСАНТА ПРИ ЛЕЧЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИНСУЛЬТА

У. К. Ибрагимов (Ташкент, Узбекистан)

В результате ишемии головного мозга в МХ и МС фракциях печени значительно накапливался МДА, активность ферментов АПА и СОД снижалась. Применение антиоксиданта эмоксипина и антигипоксанта актовегина привело к снижению МДА в МХ и МС фракциях гепатоцитов и восстановлению активностей ферментов АПА и СОД.

Ключевые слова: антиоксиданты, антигипоксанты, лечение инсульта.

Актуальность проблемы.

Установлено, что клиническая тяжесть мозгового инсульта в острейшем периоде не всегда коррелирует с дальнейшей тяжестью и течением заболевания. Поэтому важное значение имеет выявление отдельных прогностически значимых клинических показателей. Используемые в настоящее время инструментальные и параклинические методы исследования, дают представления лишь о морфологической картине мозга, в связи с чем разработка современных диагностических методов и способов лечения имеют важное клиническое значение. В настоящее время данные изучения функционального состояния мозга при ишемическом мозговом инсульте широко используется метод ЭЭГ,

исследования вызванных потенциалов мозга, вегетологические нейropsychологические и другие методы исследования. Своевременное клиничко-параклиническое прогнозирование играет немаловажное значение, как в планировании, так и в контроле проводимых лечебных мероприятий и в ее оптимизации. Учитывая вышеуказанное, нами была поставлена цель – проанализировать динамику клиничко-биохимических показателей при остром ишемическом мозговом инсульте и определить пути оптимизации лечебной тактики.

Целью настоящего исследования явился сравнительный анализ эффективности антиоксидантного и антигипоксантного препаратов при лечении

* Статья подготовлена по результатам работы Международной научно-практической конференции «Свободные радикалы и антиоксиданты в химии, биологии и медицине» (1-4 октября 2013 г.) в рамках реализации Программы стратегического развития ФГБОУ ВПО «Новосибирский государственный педагогический университет» на 2012–2016 гг.

Ибрагимов Уткур Кудратович – доктор медицинских наук, профессор кафедры биохимии, Ташкентский педиатрический медицинский институт.

E-mail: uk_ibragimov@rambler.ru

экспериментального ишемического инсульта на интенсивность генерации активных форм кислорода и состояние антиокислительной системы. Материалы и методы исследования. Исследования проведены на белых беспородных крысах самцах, исходной массой 120-130 грамм. Модель ишемии головного мозга воспроизводилась методом клипирования левой сонной артерии на протяжении 40 минут. В качестве контроля служили животные «ложнооперированные», которым вскрывали сонную артерию под эфирным наркозом с последующим послойным ушиванием ($n=6$). Забой животных проводили в сроки 1,3,6,12,24,72 часа после реперфузии. На каждый срок исследования использованы по 7-8 крыс.

Для коррекции постишемических изменений головного мозга использовали антиоксидант – эмоксипин (2-группа, производство Россия) и антигипоксант – актовегин (3-группа, производство Австрия, ABEWE). Верификацию ишемии проводили на основании морфологических исследований (окраска нитратом серебра по методу Ниссля) (Пирс Э. 1962). Митохондриальную и микросомальную фракции из гомогената печени разделяли методом дифференциального центрифугирования. Количество малонового диальдегида (МДА) определяли по методу Нагоева Б. С. с соавтором (2008), количество среднемолекулярных пептидов (СМП) по методу Габриэлян Н. И. и другие (1981). Суммарную антипероксидную активность (АПА) по методу Королюк М. А. и другие (1988) и выражали в ммоль H_2O_2 /мг белка*мин, активность супероксиддисмутазы (СОД) по методу Бруслова О. С. и соавторов (1976). Белок определяли методом Lowry O. H. et al., (1951). Статистическую обработку полученных данных, проводили в

компьютере с пакетом программ для математической обработки.

Полученные результаты и их обсуждение.

В результате экспериментальной ишемии-реперфузии головного мозга в кровь выбрасывается значительное количество нейрпептидов, МДА, СМП и других низкомолекулярных продуктов взаимодействия АФК с макромолекулами органоидов клеток. Это запускает свободнорадикальные процессы в других внутренних органах. В митохондриальной фракции (МХ) гепатоцитов в различные сроки ишемии-реперфузии обнаружено значительное накопление МДА, в 2,55 раза превышающее показатели контрольных и ложнооперированных животных в ранние сроки ишемии – реперфузии. При этом активность СОД была снижена в 1,58 раза, а активность ферментов антипероксидной защиты – в 1,27 раза ($P<0,05$). Применение эмоксипина и актовегина при лечении данных групп животных привело к снижению накопления МДА в МХ фракции гепатоцитов в 1,34 и 1,56 раза соответственно ($P<0,05$).

Влияние данных препаратов на активность ферментов АПА не отличалось друг от друга и превышало уровень аналогичных показателей нелеченных животных в 1,09-1,06 раза, что было в статистически недостоверных пределах ($P>0,05$). Разница в эффекте данных препаратов отразилась на активности СОД: в результате применения актовегина активность СОД восстанавливалась до уровня контрольных животных, тогда как в результате применения эмоксипина активность СОД увеличивалась относительно данных нелеченных животных в 1,14 раза ($P>0,05$) и не достигала значений контрольных животных. В микросомальной

фракции (МС) гепатоцитов в различные сроки ишемии-реперфузии обнаружено увеличение накопления МДА в 2,71 раза больше показателей контрольных и ложнооперированных животных. При этом активность СОД была снижена в 1,70 раза, а активность ферментов антипероксидной защиты – в 1,49 раза ($P < 0,05$). Применение эмоксипина и актовегина при лечении данных групп животных привело к снижению накопления МДА в МС фракции гепатоцитов в 1,31 и 1,82 раза соответственно ($P < 0,05$). Влияние данных препаратов на активность ферментов АПА не отличалось друг от друга и незначительно превышало уровень аналогичных показателей нелеченных животных. Разница в эффекте данных

препаратов отразилась на активности СОД: в результате применения актовегина активность СОД восстанавливалась до уровня контрольных животных, тогда как в результате применения эмоксипина активность СОД увеличивалась относительно данных нелеченных животных в 1,14 раза ($P > 0,05$) и не достигала значений контрольных животных. Выводы. В результате ишемии головного мозга в МХ и МС фракциях печени значительно накапливался МДА, активность ферментов АПА и СОД снижалась. Применение антиоксиданта эмоксипина и антигипоксанта актовегина привело к снижению МДА в МХ и МС фракциях гепатоцитов и восстановлению активностей ферментов АПА и СОД.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Клиническая** детская неврология / под ред. А.С. Петрухина: Руководство. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2008. – 1088 с.
2. **Пирс Э.** Гистохимия. – М., 1962. – 648 с.
3. **Брусов О. С., Герасимов А. И., Панченко Л. Ф.** Влияние природных ингибиторов радикальных реакций на автоокисление адреналина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1976. – 87(1). – С. 33–35.
4. **Габриэлян Н. И., Дмитриев А. А., Кулаков Г. П., Мекикян А. М., Щербанева О. И.** Диагностическая ценность определения средних молекул в плазме крови при нефрологических заболеваниях // Клиническая медицина. – 1981. – Т. LIX. – № 10. – С. 38–42.
5. **Ибрагимов К. У., Хайбуллина З. Р.** Состояние микросомальной и митохондриальной фракций печени при экспериментальной ишемии мозга у крыс // Вестник РГМУ. Журнал Всероссийского Государственного медицинского университета. – 2009. – № 3. – С. 243.
6. **Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г., Токарев В. Ф.** Метод определения каталазы // Лабораторное дело. – 1988. – С. 16–19.
7. **Нагоев Б. С., Тулупова М. В.** Изучение прооксидантных свойств плазмы крови псориазом по уровню малонового диальдегида // Клиническая лабораторная диагностика. – 2008. – № 8. – С. 15–17.
8. **Хайбуллина З. Р., Ибрагимов У. К.** Известные молекулярные механизмы нейронального повреждения при гипоксии мозга плода, обзорная статья // Медицинский журнал Узбекистана. – 2009. – № 2. – С. 64–72.
9. **Хайбуллина З. Р., Ибрагимов У. К., Салихова С. Р., Муфаздалов Ш. А.** Реакция клеточных элементов крови на общую гипоксию организма // Патология. – Ташкент. – 2010. – № 1. – С. 27–36.

© U. K. Ibragimov

UDC 616.052 + 616.003

EXPERIMENTAL STROKE: DIFFERENT AFFECT OF TREATMENT WITH ANTIOXIDANT AND ANTIHYPOXANT DRUGS

U. K. Ibragimov (Tashkent, Uzbekistan)

As a result of cerebral ischemia in the mitochondria and the microsomal fraction of the liver significantly accumulated MDA, the activity of the enzymes catalase and SOD (superoxide dismutase) decreased. The use of antioxidant emoksipina and antihypoxant aktovegina led to a decrease in MDA in the MX and MC fractions of hepatocytes and restoration activities of the enzymes SOD and APA.

Keywords: antioxidant, antihypoxant, stroke.

REFERENCES

1. **Clinical** children's neurology / ed. A.S.Petruhina: the Management. – M.: Publishing house "Medicine", 2008. – 1088 p.
2. **Pirs E.** Histology chemistry. – M., 1962. – 648 p.
3. **Brusov O. S., Gerasimov A. I., Panchenko L. F.** Influence natural inhibitors of radical reactions to autooxidation of adrenaline // The bulletin experimental biology and medicine. – 1976. – 87 (1). – pp. 33–35.
4. **Gabrieljan N. I., Dmitriev A. A., Kulakov G. P., Mekikyan A. M., Shcherbaneva O. I.** Diagnostic value of definition of average molecules in plasma of blood at nephrological diseases // Clinical medicine. – 1981. – Vol. LIX. – N 10. – pp. 38–42.
5. **Ibragimov K. U., Haibullina Z. R.** Condition mikrosomal and mitochondrial fractions of a liver at an experimental ischemia of a brain at rats. // Bulletin RSMU. Journal of the All-Russia State medical university. – 2009. – № 3. – pp. 243.
6. **Koroljuk M. A., Ivanova L. I., Majorova I. G., Tokarev V. F.** Method of definition of katalas // Laboratory business. – 1988. – pp. 16–19.
7. **Nagoev B. S., Tulupova M. V.** Studying pro-oxidizer properties of plasma of blood of psoriasis // Clinical laboratory diagnostics. – 2008. – № 8. – pp. 15–17.
8. **Hajbullina Z. R., Ibragimov U. K.** Known molecular mechanisms neuron damages at hypoxias a brain of embryo // Medical journal of Uzbekistan. – 2009. – № 2. – pp. 64–72.
9. **Hajbullina Z. R., Ibragimov U. K., Salihova S. R., Mufazdalov Sh. A.** Reaction of cellular elements of blood on the general hypoxias of organism // the Pathology. – Tashkent. – 2010. – № 1. – pp. 27–36.

Ibragimov Utkur Kudratovich – the doctor of medical sciences, the professor of faculty of Biochemistry, Tashkent Pediatric Medical Institute
E-mail: uk_ibragimov@rambler.ru

© А. В. Колесников, О. И. Баренина, А. В. Щулькин

УДК 617.741 + 004.1 + 085.27

АКТИВНОСТЬ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И СОСТОЯНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ХРУСТАЛИКА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ КАТАРАКТЕ НА ФОНЕ МЕСТНОГО ПРИМЕНЕНИЯ АНТИОКСИДАНТОВ*

А. В. Колесников, О. И. Баренина, А. В. Щулькин (Рязань, Россия)

Представлена экспериментальная оценка влияния местного применения прямого синтетического антиоксиданта ионола в сравнении с природным биоантиоксидантом – апикомпозицией, на свободнорадикальный статус хрусталика при формировании катаракты. Апикомпозиция состояла из меда, нативного маточного молочка и прополиса. Экспериментальная катаракта индуцировалась введением в стекловидное тело раствора диквата дибромида. Изучалась динамика катарактального процесса, а также в гомогенате хрусталика определялась выраженность окислительного стресса, суммарная ёмкость антиоксидантной системы, а также активность антиоксидантных ферментов. Показано, что инстилляции в конъюнктивальную полость раствора ионола приводили к регрессу и стабилизации помутнений хрусталика, значительному снижению активности перекисного окисления липидов, нормализации активности глутатион-зависимых антиоксидантных ферментов. Клинические и биохимические эффекты апикомпозиции также были достаточно выражены, но более результативным по всем показателям оказался ионол. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о патогенетической обоснованности использования при катаракте как синтетических, так и природных антиоксидантов.

Ключевые слова: катаракта, свободнорадикальный статус хрусталика, антиоксиданты, ионол, апикомпозиция.

* Статья подготовлена по результатам работы Международной научно-практической конференции «Свободные радикалы и антиоксиданты в химии, биологии и медицине» (1-4 октября 2013 г.) в рамках реализации Программы стратегического развития ФГБОУ ВПО «Новосибирский государственный педагогический университет» на 2012–2016 гг.

Колесников Александр Вячеславович – кандидат медицинских наук, доцент кафедры глазных и ЛОР-болезней, Рязанский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова Министерства здравоохранения Российской Федерации

E-mail: kolldoc@mail.ru

Баренина Ольга Игоревна – аспирант кафедры глазных и ЛОР-болезней, Рязанский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова Министерства здравоохранения Российской Федерации

E-mail: kolyuchk@mail.ru

Щулькин Алексей Владимирович – кандидат медицинских наук, ассистент кафедры фармакологии с курсом фармации и фармакотерапии факультета дополнительного профессионального образования, Рязанский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова Министерства здравоохранения Российской Федерации

E-mail: alekseyskulkin@rambler.ru

Введение.

Перекисное окисление липидов (ПОЛ), развивающееся в результате повышенной продукции свободных радикалов и снижения активности антиоксидантной системы защиты (АОС), носит цепной свободнорадикальный характер и приводит к изменению структуры и функции мембран, что в свою очередь вызывает глубокие нарушения метаболизма и гибель клеток [1–2].

Типичным примером свободнорадикальной патологии является катаракта, развитие которой во многом обусловлено повышенной продукцией свободных радикалов на фоне истощения АОС хрусталика [3–5]. Тем не менее, в настоящее время не существует местных антикатарактальных препаратов с доказанной прямой антиоксидантной активностью в ткани хрусталика, поэтому актуальной и теоретически обоснованной является разработка таких препаратов. Ранее нами в эксперименте *in vivo* исследован в качестве возможного антикатарактального средства 2,2 % масляный раствор ионола (2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенол) – синтетический пространственно-затрудненный фенол, обладающий доказанной высокой антирадикальной и антиоксидантной активностью в системах *in vitro* [6]. Применение ионола при экспериментальной дикват-индуцированной катаракте существенно снижало активность ПОЛ, увеличивало суммарную емкость АОС и активность глутатион-зависимых антиоксидантных ферментов в ткани хрусталика [6]. Известно, что синтетические препараты обладают целым рядом побочных эффектов, в связи с чем, в последние годы во всем мире возрос интерес к биологически активным веществам природного происхождения, в том числе, к биоантиоксидантам. Среди них одной из

наиболее высоких активностей обладают продукты пчеловодства, содержащие в своем составе полифенольные соединения [7]. При этом, более выраженный эффект достигается при комбинировании в одном препарате разных апипродуктов. Поэтому целью настоящего исследования являлось сравнение активности ПОЛ и состояния АОС хрусталика при экспериментальной катаракте на фоне местного применения ионола и апикомпозиции.

Материал и методы.

Работа выполнена на 39 кроликах-самцах (78 глаз) породы Шиншилла, средним весом 2000 ± 200 г и возрастом 8–10 месяцев. На 3 интактных животных (6 глаз) были определены нормальные значения исследуемых показателей. Экспериментальная катаракта воспроизводилась на обоих глазах 36 животных (72 глаза) химической индукцией свободнорадикального окисления биополимеров тканей глаза по методу Bhuyan K. C., Bhuyan D. C., 1991 [8] в нашей модификации, для чего в стекловидное тело вводили однократно 30 мкл стерильного раствора диквата дибромида в дозе 600 нмоль. В дальнейшем данные животные были разделены на 3 серии: первая серия – 12 кроликов (24 глаза) – контроль катаракты без лечения, вторая серия – введение 2,2 % масляного раствора ионола (И2,2) на фоне экспериментальной патологии, третья серия – введение апикомпозиции (АК), включающей в себя экстракт прополиса, 50 % водный раствор меда, 2 % водный раствор нативного маточного молочка на фоне экспериментальной катаракты.

Помутнения хрусталика определяли методами проходящего света и биомикроскопии. К концу каждого интервала выведения животных из опыта оценивали динамику катарактального процесса по 3

критериям: прогресс (нарастание патологических изменений), стабилизация и регресс (уменьшение патологических изменений). Лечение начинали с 7-х суток, когда формировались начальные признаки помутнения хрусталиков, и проводили путем инстилляций препаратов в конъюнктивальную полость глаз 3 раза в день.

Препараты на основе продуктов пчеловодства готовились по авторской технологии. Для биохимических исследований животных выводили из опыта методом газовой эмболии под тиопенталовым наркозом на 14, 28, 42 и 56 суток эксперимента. На каждый срок из опыта выводили по 3 кролика (6 глаз). Затем глаза энуклеировали и выделяли кортекс хрусталика. В его гомогенате определяли концентрацию ТБК-реактивных продуктов ПОЛ (в дальнейшем, условно, малонового диальдегида (МДА) – кМДА) (Гаврилова В. Е. и др., 1987); суммарную емкость АОС ткани (по продолжительности лаг-фазы накопления МДА (лаг-МДА) и максимальной скорости накопления МДА за 5-ти минутный интервал (сМДА) в инкубируемом при 37°C в течение 60 минут гомогенате тканей) (Patel R. P. et al., 2001); концентрацию небелковых (GSH) сульфгидрильных групп (по методу Ellman G. L., 1959); активность Se-зависимой глутатионпероксидазы (GPx) (по Paglia D. E., Valentine W. N., 1967 в модификации Ланкина В. З., 1976), глутатион-S-трансферазы (GT) (по Keen J. N., Iakoby W. B., 1978).

Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием программ «Биостат» и Statsoft Statistica 6.1. Характер распределения данных определяли по критерию Шапиро-Уилка. Для исследования статистической значимости показателей, имеющих нормальное распределение,

использовали тест ANOVA, а данных имеющих распределение отличное от нормального – тест Крускала-Уоллиса. Различия между сериями определяли по критерию Ньюмена-Кейсла.

Результаты.

Введение в стекловидное тело раствора диквата дибромида вызывало появление начальных признаков катаракты у части животных на 2 сутки, тогда как к 7 суткам эти изменения наблюдались у всех животных. Зафиксировано появление мелких субкапсулярных и кортикальных вакуолей, единичных точечных помутнений в задних и передних корковых слоях. С 7 до 14 суток во всех глазах количество мелких вакуолей в коре несколько увеличивалось при неизменном размере уже имевшихся, появлялись симптомы диссоциации и зияния швов коры. Размеры и количество белковых агрегатов практически не изменялись. С 14-х до 28-х суток во всех случаях было зафиксировано слияние вакуолей, увеличение размеров и числа белковых агрегатов. Площадь зон диссоциации коры увеличивалась, зияние швов коры стало больше. Было отмечено формирование водяных щелей, при чем, к 28-м суткам их содержимое начало мутнеть. Появлялись участки разрушения волокон в местах выраженной диссоциации. Набухание ткани хрусталика увеличивалось, что проявлялось некоторым уменьшением глубины передней камеры. С 28-х до 42-х суток в 11 глазах было зафиксировано значительное разрушение волокон и упорядоченной структуры кортекса изучаемой ткани. Количество белковых агрегатов и их размеры, так как и вакуолей, практически не изменялось. Содержимое водяных щелей помутнело, их границы стали трудно различимы. Зоны разрушения волокон коры хрусталика заняли

всю площадь диссоциации. Степень набухания не изменилась. В 1 случае за этот период катаракта оставалась без динамики. С 42-х до 56-х суток эксперимента в 5 случаях нарастали дезорганизация и разрушение волокон кортекса, белковые агрегаты существенно увеличивались. Число вакуолей уменьшалось, а размеры несколько увеличивались за счёт слияние соседних. Водяные щели как морфологический элемент исчезали, на их месте сформировывались участки помутнения коры. В 1 глазу динамики катарактальных изменений хрусталика отмечено не было. У всех животных интравитреальная инъекция раствора диквата дибромида не вызывала воспалительной реакции оболочек глаза. Внутриглазной гипертензии зафиксировано не было. Формирование катаракты сопровождалось существенной активацией ПОЛ (повышение концентрации кМДА, снижение содержания GSH) при значимом истощении АОС (уменьшение активностей GPx и GT).

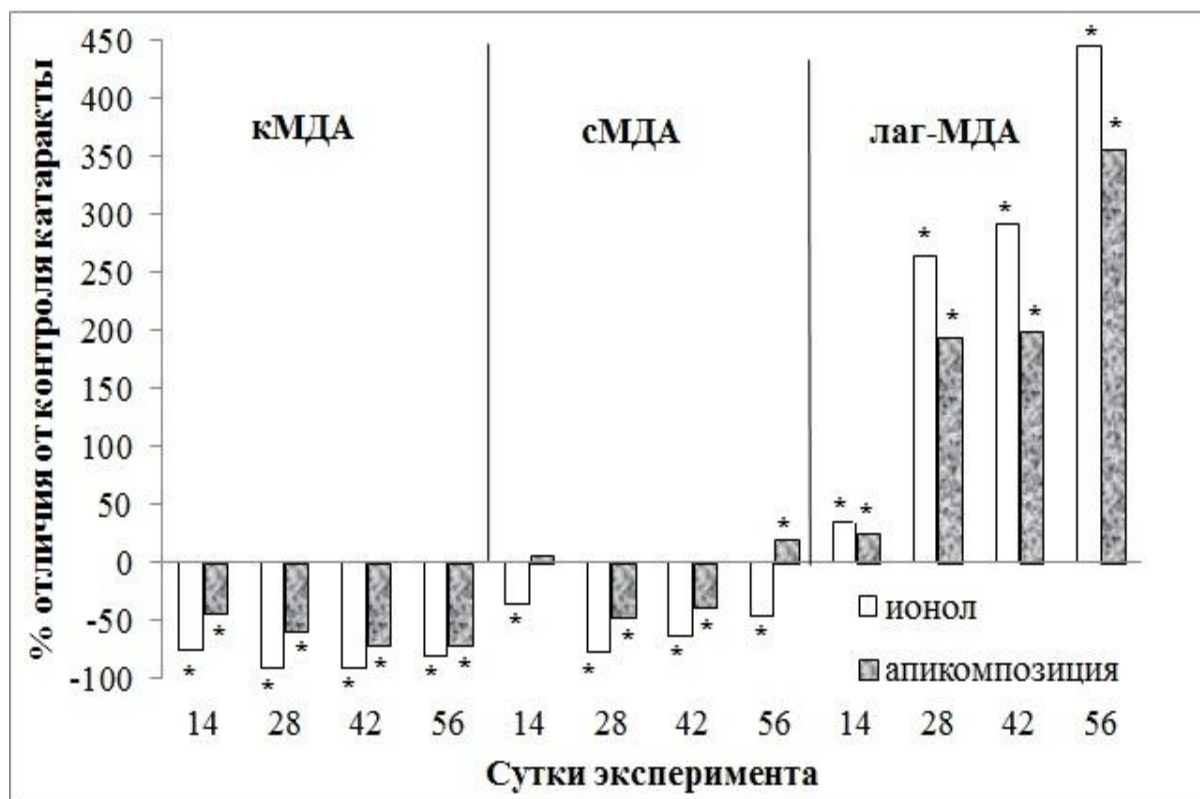
В глазах с прогрессирующей катарактой при использовании И2,2 и АК полностью отсутствовало формирование водяных щелей в коре хрусталика и грубых помутнений, во всех случаях не было зафиксировано явных признаков набухания ткани хрусталика (глубина передней камеры не менялась), не происходило формирования крупных белковых агрегатов и вакуолей. При терапии И2,2 до 28-х суток эксперимента не наблюдались симптом зияния швов коры и существенная деструкция волокон хрусталика, тогда как при лечении АК эти морфологические признаки были зафиксированы уже после 14-х суток опыта.

Биохимические эффекты проводимого лечения были следующие. На 14 и 28 сутки при лечении указанными средствами кМДА была ниже, чем в серии без лечения ($p<0,05$) (рис. 1). По степени снижения кМДА наиболее эффективным был ионол (на 74,3 % и 90,0 % ниже контроля, $p<0,05$). АК оказывала меньший, но достоверный эффект (на 43,8 и 58,8 % ниже контроля, $p<0,05$). На 42 сутки характер и степень влияния испытуемых препаратов на кМДА были прежними (рис. 1). К концу срока наблюдения кМДА оставалась ниже контроля на фоне И2,2 на 80,2 %, а на фоне АК – на 70,2 % ($p<0,05$), однако, нормы эти показатели не достигали.

Скорость накопления МДА при лечении ионолом на 14 сутки была на треть ниже контроля ($p<0,05$), а на 28 сутки – на 77,1 % ($p<0,05$) (рис. 1). На фоне АК сМДА на 28 сутки была ниже контроля на 46,9 % ($p<0,05$). К 42 дню указанная тенденция сохранялась. На 56 сутки при использовании И2,2 отмечалась нормализация сМДА, а на фоне АК она превышала контроль на 20,0 % ($p<0,05$) и оставалась существенно выше нормы.

На 14 сутки лаг-МДА была достоверно выше, чем в контроле при использовании И2,2 (на 34,5 %, $p<0,05$) и АК (на 25,7 %, $p<0,05$) (рис. 1). На 28 и 42 сутки было отмечено наибольшее значение лаг-МДА для И2,2 и АК, а к 56 дню данный показатель превышал контроль на фоне И2,2 на 444,4% ($p<0,05$), АК – на 355,6% ($p<0,05$). Применение И2,2 и АК позволило нормализовать продолжительность лаг-МДА во все сроки наблюдения.

Изменения кМДА, сМДА и лаг-МДА в хрусталике животных серий лечения по сравнению с контролем катаракты (* – $p < 0,05$ – достоверные различия по сравнению с показателями животных серии контроля катаракты).



Наиболее высокий уровень GSH на фоне лечения был установлен на 42 сутки, когда концентрация GSH превышала контроль на фоне И2,2 в 20,5 раза ($p < 0,05$), а на фоне АК – в 21,5 раз ($p < 0,05$) (рис. 2). На 56 сутки указанная тенденция сохранялась. Разница в концентрации GSH в сравнении с нормой на фоне И2,2 на протяжении всего опыта была недостоверной. При использовании АК концентрация GSH соответствовала норме и только на 28 сутки была снижена на 30,3% ($p < 0,05$).

Активность антиоксидантных ферментов изменялась неоднозначно в различных сериях (рис. 2). На 14 сутки активность GPx не отличалась от контроля для всех препаратов. На 28 день при использовании АК этот показатель превышал контроль на 40,0 % ($p < 0,05$), а на фоне И2,2 – на 32 %, 5 % ($p < 0,05$). На 42 сутки GPx была достоверно выше, чем в контроле на фоне

применения АК (на 125,7 %, $p < 0,05$) и И2,2 (на 112,5 %, $p < 0,05$). К 56 суткам GPx была достоверно выше контроля при лечении И2,2 (в 3,4 раза, $p < 0,05$), АК (в 3,3 раза, $p < 0,05$) и была идентична интактной ткани. Уже на 14 сутки активность GT была выше по отношению к контролю для И2,2 (на 102,9 %, $p < 0,05$), АК (на 26,6 %, $p < 0,05$). На 28 день на фоне всех препаратов активность фермента сохранялась на высоком уровне с увеличением разницы с контролем, а на 42 сутки превышала его при применении И2,2 в 5 раз ($p < 0,05$) и АК в 3 раза ($p < 0,05$). На 56 сутки активность GT при использовании И2,2 была на порядок выше, чем в серии контроля (в 9,8 раза, $p < 0,05$) и значительно превышала норму. На фоне АК активность GT превышала контроль в 5,3 раза ($p < 0,05$) и приближалась к норме.

Обсуждение.

На фоне применения И2,2 нами было получено выраженное снижение кМДА в ткани хрусталика относительно контроля, что отражает практическую нормализацию активности ПОЛ. Также было зафиксировано улучшение функционального состояния антиоксидантной системы хрусталика в виде увеличения продолжительности лаг-МДА и снижения сМДА в хрусталике. Являясь липофильным соединением, ионол обладает достаточно высокой антирадикальной активностью, что позволяет ему, инактивируя радикалы, уменьшать истощение эндогенных компонентов АОС ткани и пополнять пул липофильных антиоксидантов в исследуемой ткани [6]. Отсутствие достоверного изменения относительно нормальной ткани активности GPx, видимо, связано с предотвращением перекисной деградации мембран под действием ионола. Без достаточного разрушения фосфолипидов мембран нет активации цитозольной Se-зависимой GPx, без достаточно высокой активности ПОЛ уменьшается степень окисления и инактивации этого фермента продуктами реакций свободнорадикального окисления биополимеров. Высокая активность GT может быть объяснена индукцией этого фермента ионолом и недостаточной для инактивации фермента активности ПОЛ [9]. Применение препарата на основе апипродуктов вызывало выраженное снижение активности ПОЛ и улучшение состояния АОС. Было зафиксировано существенное уменьшение кМДА, увеличение суммарной емкости АОС и улучшение функционального состояния ферментного глутатион-зависимого звена АОС. Выраженный антиоксидантный эффект комбинированного препарата, видимо, связан с прямым действием антиоксидантных

компонентов АК. Увеличение суммарной емкости АОС хрусталика может быть объяснено встраиванием прямых биоантиоксидантов АК в АОС хрусталика, а также более высокой активностью GPx и GT на фоне достаточно высокой концентрации восстановленного глутатиона. Отсутствие инактивации GT при повышенной относительно уровня нормы активности GPx может свидетельствовать о напряжении антиоксидантной защиты, которая предотвратила значительное разрушение мембран и инактивацию GT. Более высокая концентрация GSH в тканях хрусталика относительно группы контроля катаракты может быть связана со снижением активности ПОЛ и уменьшением потребления GSH. Вероятно, позитивное влияние компонентов АК на метаболизм хрусталика также могло способствовать поддержанию высокой концентрации GSH, так как для ферментативного восстановления этого трипептида необходим достаточный уровень НАДФ*H₂. Достигнутые изменения характера течения и тяжести патологического процесса согласуются с полученными биохимическими эффектами.

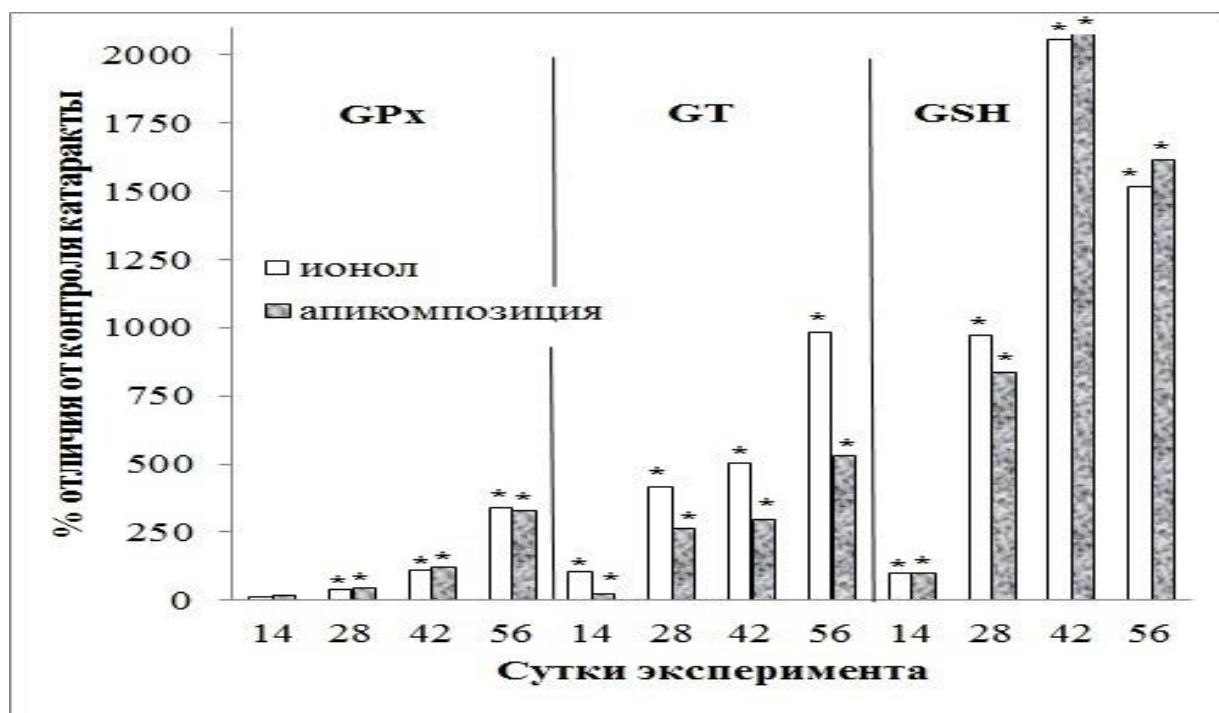
Выводы

1. При дикуват-индуцированной модели катаракты ионол оказывает существенное антикатарактальное действие, достоверно снижает активность перекисного окисления липидов, обладает выраженным позитивным влиянием на активность глутатион-зависимых антиоксидантных ферментов и суммарную емкость антиоксидантной системы.

2. По комплексу морфо-биохимических показателей и антикатарактальному действию апикомпозиция экстракта прополиса, меда и нативного маточного молочка сопоставима с ионолом.

Рисунок 2.

Состояние глутатионного звена антиоксидантной системы в хрусталике животных серий лечения по сравнению с контролем катаракты (– $p < 0,05$ – достоверные различия по сравнению с показателями животных серии контроля катаракты).*



СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Меньщикова Е. Б., Ланкин В. З., Зенков Н. К. и др.** Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. – М.: Слово, 2006. – 576 с.
2. **Semenza G. L.** Oxygen Sensing, Homeostasis, and Disease // New England Journal Medicine. – 2011. – Vol. 365. – Pp. 537–547.
3. **Berthoud V. M., Beyer E. C.** Oxidative Stress, Lens Gap Junctions, and Cataracts // Antioxidant & Redox Signaling. – 2009. – Vol. 11(2). – Pp. 339–353.
4. **Zheng Y., Liu Y., Ge J. et al.** Resveratrol protects human lens epithelial cells against H₂O₂-induced oxidative stress by increasing catalase, SOD-1, and HO-1 expression Molecular Vision. – 2010. – Vol. 16. – Pp. 1467–1474.
5. **Liu H., Smith A. J. O., Lott M. C. et al.** Sulforaphane Can Protect Lens Cells Against Oxidative Stress: Implications for Cataract Prevention // Investigative Ophthalmology Visual Science. – 2013. – Vol. 54(8). – Pp. 5236–5248.
6. **Колесников А. В.** Подбор эффективной антиоксидантной дозы ионола для ткани хрусталика при местном инстилляционном введении его масляного раствора // Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова. – 2006. – № 2. – С. 66–70.
7. **Вахонина Т. В.** Пчелиная аптека. – СПб.: Лениздат, 1992. – 188 с.
8. **Bhuyan K. C., Bhuyan D. C., Podos S. M.** Free radical enhancer xenobiotic is an inducer of cataract in rabbit // Free Radical Research. Community. – 1991. – Pt.2. – Pp. 12–13.
9. **Ланкин В. З., Тихазе А. К., Беленков Ю. Н.** Свободнорадикальные процессы в норме и при заболеваниях сердечно – сосудистой системы. – М.: РКНПК МЗ РФ, 2001. – 78 С.

© A. V. Kolesnikov, O. I. Barenina, A. V. Schulkin (Ryazan, Russia)

UDC 617.741 + 004.1 + 085.27

ACTIVITY OF LIPID PEROXIDATION AND CONDITION OF LENS ANTIOXIDANT SYSTEM ON THE EXPERIMENTAL CATARACT AGAINST THE BACKGROUND OF LOCAL ANTIOXIDANTS

A. V. Kolesnikov, O. I. Barenina, A. V. Schulkin (Ryazan, Russia)

In the present research we have made a comparative analysis of the influence of a local application of direct synthetic antioxidant ionol, and natural biological antioxidant apicomposition on the lens free-radical status during cataract formation. Apicomposition consisted of honey, native royal jelly and propolis. Experimental cataract was induced by a single injection of diquat dibromide water solution into the vitreous body. The dynamics of the cataract process and the severity of oxidative stress, total antioxidant system capacity and activity of antioxidant enzymes in the lens were determined. It is shown that instillation into the conjunctival cavity Ionol solution led to regression (50%) and stabilization (33 %) lens opacities, significant reduction the activity of lipid peroxidation, normalization activity of glutathione-dependent antioxidant enzymes. Clinical and biochemical effects of apicomposition were also quite pronounced, but more effective in all parameters was ionol. Thus, the findings suggest the feasibility of using synthetic and natural antioxidants for pathogenic cataract treatment.

Keywords: cataract, lens free radical status, antioxidants, ionol, apicomposition.

REFERENCES

1. **Menshchikova E. B., Lankin V. Z., Zenkov N. K. et al.** Oxidative stress. Pro-oxidants and antioxidants. – M.: Word 2006. – 576 p.
2. **Semenza G. L.** Oxygen Sensing, Homeostasis, and Disease // New England Journal Medicine. – 2011. – Vol. 365. – Pp. 537–547.
3. **Berthoud V. M., Beyer E. C.** Oxidative Stress, Lens Gap Junctions, and Cataracts // Antioxidant & Redox Signaling. – 2009. – Vol. 11 (2). – Pp. 339–353.
4. **Zheng Y., Liu Y., Ge J. et al.** Resveratrol protects human lens epithelial cells against H₂O₂-induced oxidative stress by increasing catalase, SOD-1, and HO-1 expression // Molecular Vision. – 2010 – Vol. 16. – Pp. 1467–1474.
5. **Liu H., Smith A. J. O., Lott M. C. et al.** Sulforaphane can protect lens cells against oxidative stress: implications for cataract prevention // Investigative Ophthalmology Visual Science. – 2013. – Vol. 54 (8). – Pp. 5236–5248.
6. **Kolesnikov A. V.** Selection of an effective antioxidant ionol doses for lens tissue when it is administered locally in oil solution / Russian Medical and Biological Journal named after academic I. P. Pavlov. – 2006. – № 2. – Pp. 66–70.
7. **Vakhonin T. V.** Bee pharmacy. – St. Petersburg.: Lenizdat, 1992. – 188 p.

8. **Bhuyan K. C., Bhuyan D. C., Podos S. M.** Free radical enhancer xenobiotic is an inducer of cataract in rabbit // Free Radical Research. Community. – 1991. – Rt. 2. – Pp. 12–13.
9. **Lankin V. Z., Tihaze A. K., Belenkov Y. N.** Free radical processes in health and cardiovascular diseases. – Moscow : RCSPC, 2001. – 78 p.

Kolesnikov Aleksandr Vyacheslavovich – PhD, docent at the Department of Eye and ENT diseases, Ryazan State Medical University

E-mail: kolldoc@mail.ru

Barenina Olga Igorevna – aspirant at the Department of Eye and ENT diseases at the Department, Ryazan State Medical University

E-mail: kolyuchk@mail.ru

Schulkin Aleksey Vladimirovich – PhD, assistant at the pharmacology department, Ryazan State Medical University

E-mail: alekseyschulkin@rambler.ru

© Е. Б. Кучменко

УДК 577.161.6 + 579.61

БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ УБИХИНОНА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ*

Е. Б. Кучменко (Киев, Украина)

Целью данного исследования было изучить влияние комплексов предшественников и модуляторов биосинтеза КоQ на энергетические процессы и чувствительность митохондриальной поры переходной проницаемости к действию индукторов ее открытия в митохондриях сердца при адреналин- и доксорубицин-индуцированных повреждениях. В работе был исследован уровень и функциональная активность КоQ при адреналин- и доксорубицин-индуцированном повреждении сердца, которое сопровождается развитием митохондриальной дисфункции. Полученные результаты свидетельствуют об эффективности комплексов предшественников и модуляторов биосинтеза КоQ для коррекции митохондриальной дисфункции. В частности, наблюдается нормализация содержания КоQ, витамина E, активности комплексов I, II и IV цепи транспорта электронов в митохондриях сердца. При адреналин- и доксорубицин-индуцированном повреждении сердца наблюдается возрастание чувствительности митохондриальной поры переходной проницаемости к действию индукторов ее открытия – Ca^{2+} и ФАО, что может приводить к увеличению проницаемости митохондриальной мембраны в тканях сердца. При введении животным комплексов ЕПМ и ЕПМД наблюдается снижение чувствительности митохондриальной поры переходной проницаемости к воздействию Ca^{2+} и ФАО (на 50–90 %). Представленные в работе экспериментальные данные открывают перспективу создания новых патогенетически обоснованных подходов и средств для профилактики и лечения метаболических нарушений при сердечно-сосудистых патологиях.

Ключевые слова: убихинон, митохондрия, адреналин, доксорубицин, митохондриальная пора переходной проницаемости.

Митохондрии играют одну из важнейших функций в клетке, а именно, обеспечивают ее энергетические потребнос-

ти. Кроме этого, митохондрии контролируют уровень клеточной пролиферации, апоптоз и процессы старения. Митохондриям принадле-

* Статья подготовлена по результатам работы Международной научно-практической конференции «Свободные радикалы и антиоксиданты в химии, биологии и медицине» (1-4 октября 2013 г.) в рамках реализации Программы стратегического развития ФГБОУ ВПО «Новосибирский государственный педагогический университет» на 2012–2016 гг.

Кучменко Елена Борисовна – доктор биологических наук, доцент, кафедра медико-биологических и валеологических основ охраны жизни и здоровья, Национальный педагогический университет имени М. П. Драгоманова
E-mail: kuchmeb@yahoo.com

ит и центральная роль в продукции активных метаболитов кислорода (АМК) [1–3]. Какое-либо патологическое состояние, которое ведет к нарушению обмена веществ, приводит к обратимому или необратимому повреждению митохондрий. Достаточно важной морфологической особенностью повреждения митохондрий является их набухание, которое имеет место в клетках миокарда при сердечной недостаточности, а также при многих инфекционных, гипоксических, токсических и других патологических процессах. Набухание митохондрий может быть не только следствием, но и причиной их дальнейшего повреждения [4–5]. Сегодня не вызывает сомнения, что митохондриальная дисфункция играет важную роль в патогенезе многих заболеваний, в первую очередь сердечно-сосудистой системы.

Убихинон (КоQ) играет центральную роль в биоэнергетических процессах в клетке в первую очередь как транспортер протонов и электронов в цепи транспорта электронов во внутренней мембране митохондрий. КоQ является также важным жирорастворимым антиоксидантом, который принимает участие как в обезвреживании АМК, так и в регенерации других антиоксидантов, в первую очередь витамина Е. При определенных обстоятельствах КоQ может выступать и в роли прооксиданта, что указывает на функционирование его как модулятора редокс-состояния клетки при физиологических и патологических состояниях, а также при старении. Продемонстрирована также роль КоQ в регуляции функционального состояния митохондриальной поры переходной проницаемости (mPTP), которая задействована в механизмах апоптоза [6–7].

Биосинтез КоQ является сложным многостадийным процессом, который происходит последовательно в разных субклеточных фракциях практически всех тканей организма. Механизмы регуляции эндогенного биосинтеза КоQ достаточно сложны и реализуются при участии различных факторов эндогенной и экзогенной природы (гормоны, незаменимые аминокислоты, некоторые витамины, ксенобиотики и др.). Потому достаточно часто наблюдаются нарушения биосинтеза КоQ и в здоровом организме (при недостаточном, нерациональном питании, дефиците витаминов, экологических нарушениях), не говоря уже о различных заболеваниях, которые сопровождаются нарушениями внутриклеточного обмена в целом, и торможением биосинтеза КоQ в частности. Кроме того, снижение интенсивности эндогенного синтеза КоQ наблюдается также с возрастом (после 30 лет) [6, 8–9]. Поэтому КоQ отнесен к группе витаминоподобных природных биологически активных соединений. Кроме эндогенного КоQ организм человека и животных может усваивать экзогенный КоQ с пищей или в виде препаратов. При нарушении биосинтеза КоQ его количество, которое поступает с пищей, не может полностью обеспечить физиологические потребности организма млекопитающих, особенно при развитии или уже существовании патологий, которые связаны с нарушением биоэнергетического обмена. Таким образом, для обеспечения потребностей организма в КоQ необходимо дополнительное его поступление экзогенно в виде лечебных препаратов, которые эффективно используются в терапии широкого спектра заболеваний. Однако такой подход имеет ряд недостатков, а именно, после окончания курса лечения не

наблюдается восстановления и активации ферментных систем эндогенного биосинтеза КоQ, угнетается эндогенный синтез КоQ, возможно, за счет механизма субстрат-ферментного ингибирования [6], что делает актуальным поиск новых подходов и средств стимуляции эндогенного синтеза КоQ.

В предыдущих работах было продемонстрировано усиление биосинтеза, накопления и функционирования КоQ при введении животным витамина Е. Кроме того, использование одного из промежуточных продуктов биосинтеза КоQ – 4-гидроксibenзойной кислоты (ПОБК) вместе с витамином Е предупреждало развитие мышечной дистрофии и активировало КоQ-зависимые ферментные системы митохондрий. Также показано, что метионин является важным донором метильных групп в синтезе молекулы КоQ [10].

Таким образом, целью данного исследования было изучить влияние комплексов предшественников и модуляторов биосинтеза КоQ на энергетические процессы и чувствительность митохондриальной поры переходной проницаемости к действию индукторов ее открытия в митохондриях сердца при адреналин- и доксорубин-индуцированных повреждениях.

Материалы и методы.

В экспериментах использовали белых беспородных крыс-самцов массой тела 180–220 г. Крыс содержали на стандартном рационе вивария. Адреналин-индуцированное повреждение моделировали путем введения животным внутримышечно 0,5 мл 0,1 % раствора адреналина гидрохлорида (адреналин-Дарница, ФФ ЗАО «Дарница», Украина) [11]. Доксорубин-индуцированное повреждение моделировали путем введения животным доксорубина (доксорубин-КМП, доксорубин гидрохлорид, ОАО

«Киевмедпрепарат», Украина) внутривенно в дозе 2,2 мг/кг массы тела ежедневно однократно на протяжении 8 суток [12–13]. В серии исследований при введении животным адреналина исследуемые комплексы биологически активных соединений (комплекс ЕПМ – α -токоферолаацетат, ПОБК и метионин; комплекс ЕПМД – α -токоферолаацетат, ПОБК, метионин и диметилсульфоксид) вводились с лечебной целью перорально после введения адреналина на протяжении 15 суток (животных декапитировали на 16-е сутки). В серии исследований при введении животным доксорубина исследуемые комплексы биологически активных соединений (комплекс ЕПМ – α -токоферолаацетат, ПОБК и метионин; комплекс ЕПМД – α -токоферолаацетат, ПОБК, метионин и диметилсульфоксид) вводились перорально ежедневно однократно на протяжении 8 суток параллельно с доксорубином. Количества введенных биологически активных соединений указаны в патенте Украины [14].

Животных декапитировали с учетом требований Международной конвенции по правилам гуманного обращения с животными.

Сердца промывали охлажденным 0,9 % раствором КСl. Митохондрии выделяли с помощью метода дифференциального центрифугирования [15]. О чистоте этих субклеточных структур судили по активности сукцинатдегидрогеназы и данных электронномикроскопических исследований.

Содержание белка в суспензии митохондрий определяли по методу Лоури [16]. КоQ и витамин Е разделяли с помощью тонкослойной хроматографии [17]. Содержание КоQ в тканях и митохондриях определяли спектрофотометрически [17]. Для этого измеряли спектр окисленной формы

КоQ при длинах волн 270, 275 и 290 нм, затем добавляли 2,5 % раствор КВН₄, и через 10 минут при тех же длинах волн измеряли экстинцию восстановленной формы КоQ. Содержание КоQ рассчитывали по разнице величин экстинции его окисленной и восстановленной форм при 275 нм. Содержание витамина Е определяли фотокалориметрически по реакции Эммери-Энгеля с дипиридилем и хлористым железом.

NQR (НАДН-КоQ-оксидоредуктазную) активность определяли спектрофотометрически по степени окисления НАДН при длине волны 340 нм [18]. SQR (сукцинат-КоQ-оксидоредуктазную) активность определяли спектрофотометрически по степени восстановления 2,6-дихлорфенолиндофенола восстановленным КоQ при длине волны 600 нм [19]. Цитохромоксидазную активность определяли по степени окисления цитохрома с спектрофотометрически при длине волны 550 нм [20].

Исследование открытия митохондриальной поры переходной проницаемости (mPTP) проводили с помощью спектрофотометрической регистрации набухания митохондрий, изолированных из сердца крыс [21]. Для этого изолированные митохондрии помещали в инкубационную среду изотонического состава (ммоль/л): KCl – 120, трис-оксиметил-аминометан-HCl – 25, KН₂РO₄ – 3, рН 7,4 (конечный объем – 3 мл) и регистрировали снижение их оптической плотности при длине волны 520 нм за 3 минуты до и через 15 минут после их набухания в присутствии индуктора (Са²⁺ либо фениларсеноксида (ФАО)) в инкубационной среде. Концентрация белка в инкубационной среде составляла 0,3 мг/мл. В

качестве контроля использовали суспензию интактных митохондрий в инкубационной среде в отсутствие индуктора с последующей регистрацией оптической плотности на протяжении 15 минут.

Полученные результаты обработаны методами вариационной статистики с помощью программ Excel (MS Office XP) и Origin 6.0 (OriginLab Corporation). Данные представлены в виде средней величины ± стандартное отклонение. Достоверность разницы двух средних величин оценивали по t-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение.

Катехоламины играют важную роль в процессах жизнедеятельности организма. Однако при значительном и длительном повышении содержания этих веществ в крови модуляторный компонент оказывается недостаточно эффективным и адренергическая реакция из адаптационно-компенсаторной трансформируется в патологическую с возникновением так называемых катехоламиновых повреждений миокарда и других органов [22].

Результаты собственных исследований показали, что при введении адреналина у животных наблюдается снижение содержания КоQ в митохондриях сердца в 1,5 раза по сравнению с контролем (табл. 1). Курсовое лечебное введение комплексов ЕПМ и ЕПМД приводило к возрастанию содержания КоQ. Содержание витамина Е в митохондриях сердца при введении адреналина также снижалось (табл. 1). Введение комплексов ЕПМ и ЕПМД сопровождалось достоверным возрастанием содержания витамина Е в митохондриях сердца по сравнению с животными, которым вводили только адреналин.

Таблица 1.

Содержание КоQ и витамина E в митохондриях сердца животных при введении адреналина и комплексов предшественников и модуляторов биосинтеза КоQ ($M \pm m$, $n=6$).

Группы	КоQ, мкг/г белка	Витамин E, мг/г белка
Контроль	1139,24 \pm 126,58	6,02 \pm 0,46
Адреналин	747,99 \pm 71,51*	3,19 \pm 0,48*
Адреналин + ЕПМ	1181,03 \pm 251,98#	7,22 \pm 0,41#
Адреналин + ЕПМД	1102,79 \pm 133,87#	6,60 \pm 1,20#

*Примечание: * – разница достоверна по сравнению с контролем, # – разница достоверна по сравнению с группой животных, которым вводили адреналин, $p \leq 0,05$.*

При адреналин-индуцированом повреждении в митохондриях сердца наблюдается снижение активности комплексов I, II и IV цепи транспорта электронов в митохондриях по отношению к контролю. Введение

комплексов ЕПМ и ЕПМД приводило к повышению величин этих показателей (табл. 2), что может указывать на нормализацию работы дыхательной цепи митохондрий сердца.

Таблица 2.

НАДН-КоQ-оксидоредуктазная, сукцинат-КоQ-оксидоредуктазная и цитохромоксидазная активности в митохондриях сердца животных при введении адреналина и комплексов предшественников и модуляторов биосинтеза КоQ ($M \pm m$, $n=6$).

Группы	NQR, ммоль НАДН в 1 мин на 1 мг белка	SQR, ммоль сукцината в 1 мин на 1 мг белка	Цитохромоксидазная активность, ммоль цитохрома c в 1 час на 1 мг белка
Контроль	10,13 \pm 1,31	21,70 \pm 2,11	1,51 \pm 0,17
Адреналин	7,17 \pm 0,50*	14,33 \pm 1,21*	0,62 \pm 0,07*
Адреналин + ЕПМ	8,33 \pm 0,96*	16,50 \pm 3,39	1,60 \pm 0,18#
Адреналин + ЕПМД	8,37 \pm 0,68	21,16 \pm 1,63#	1,59 \pm 0,18#

*Примечание: * – разница достоверна по сравнению с контролем, # – разница достоверна по сравнению с группой животных, которым вводили адреналин, $p \leq 0,05$.*

Известно, что одним из механизмов нарушения функции сердца является накопление в цитоплазме кардиомиоцитов ацил-КоА с последующим ингибированием АТФ-синтетической функции митохондрий [23]. Этому процессу содействует возрастающий дефицит переносчиков

электронов – цитохрома c и КоQ, который связан с их выходом из митохондрий и угнетением синтеза КоQ [23–24]. Поэтому позитивные эффекты, которые получены при введении животным комплексов ЕПМ и ЕПМД можно объяснить увеличением уровня КоQ и его прямым корректирующим

воздействием на электрон-транспортную функцию дыхательной цепи митохондрий сердца.

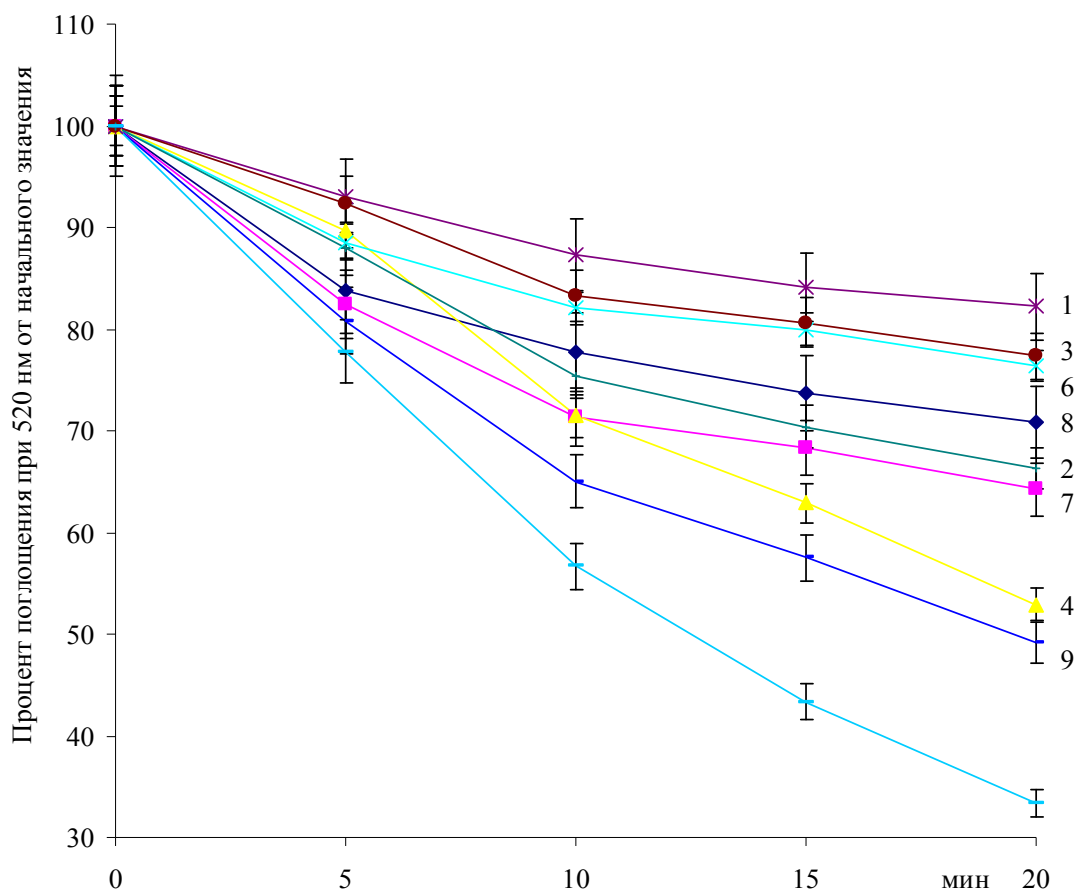
Как известно, одним из механизмов повреждающего действия катехоламинов является изменение проницаемости мембран [22]. В результате проведенных исследований показано, что при введении животным адреналина в митохондриях сердца наблюдается возрастание чувствительности mPTR к действию ФАО – неспецифического индуктора ее открытия (рис.1, кривая 4, 5) по сравнению с контролем (рис.1, кривая 1, 2). При введении животным комплексов ЕПМ и ЕПМД с лечебной целью наблюдается

уменьшение чувствительности mPTR к действию ФАО в митохондриях сердца по сравнению с животными, которым вводили только адреналин (рис.1).

Таким образом, в результате проведенных нами исследований показано, что использование комплексов предшественников и модуляторов биосинтеза КоQ при адреналин-индуцированном повреждении сердца с лечебной целью позволяет повысить содержание КоQ, витамина Е, улучшить показатели активности комплексов I, II и IV цепи транспорта электронов в митохондриях сердца, а также снизить чувствительность mPTR к действию индуктора ее открытия.

Рисунок 1.

Степень набухания митохондрий сердца контрольных животных, животных, которым вводили адреналин и комплексы ЕПМ и ЕПМД в условиях действия индуктора ФАО ($M \pm m$, $n=6$).



Примечание:

- 1 – митохондрии контрольных животных;
- 2 – митохондрии контрольных животных, действие ФАО (10^{-4} моль/л);
- 3 – преинкубация митохондрий контрольных животных с циклоспорином А (10^{-5} моль/л), ФАО (10^{-4} моль/л);
- 4 – митохондрии животных, которым вводили адреналин;
- 5 – митохондрии животных, которым вводили адреналин, действие ФАО (10^{-4} моль/л);
- 6 – митохондрии животных, которым вводили адреналин и комплекс ЕПМ;
- 7 – митохондрии животных, которым вводили адреналин и комплекс ЕПМ, действие ФАО (10^{-4} моль/л);
- 8 – митохондрии животных, которым вводили адреналин и комплекс ЕПМД;
- 9 – митохондрии животных, которым вводили адреналин и комплекс ЕПМД, действие ФАО (10^{-4} моль/л).

Общеизвестно, что доксорубин (адриамицин), антибиотик антрациклинового ряда, является одним из наиболее эффективных противоопухолевых препаратов. Однако широкое использование этого препарата ограничивается его токсичностью по отношению к сердцу, печени, почкам [25]. Повреждающий эффект доксорубина связывают с активацией процессов свободнорадикального окисления и развитием окислительного стресса, нарушением процесса транскрипции в ядрах,

окислительного фосфорилирования в митохондриях [25–26].

В результате проведенных исследований показано, что в митохондриях сердца животных, которым вводили доксорубин, наблюдается повышение содержания КоQ и витамина Е (табл. 3), что, возможно, связано с развитием реакции адаптации. При введении параллельно с доксорубином комплексов ЕПМ и ЕПМД наблюдается снижение содержания КоQ и витамина Е до уровня величин, близких к контрольным.

Таблица 3.

Содержание КоQ и витамина Е в митохондриях сердца животных при введении доксорубина и комплексов предшественников и модуляторов биосинтеза КоQ ($M \pm m$, $n=6$).

Группы	КоQ, мкг/г белка	Витамин Е, мг/г белка
Контроль	110,07±14,38	7,19±0,86
Доксорубин	286,60±37,46*	10,01±1,20*
Доксорубин + ЕПМ	101,26±13,23#	6,83±0,82#
Доксорубин + ЕПМД	174,59±22,82*#	8,41±1,01

Примечание: * – разница достоверна по сравнению с контролем, # – разница достоверна по сравнению с группой животных, которым вводили доксорубин, $p \leq 0,05$.

NQR-активность в митохондриях сердца животных при введении им доксорубина достоверно не изменяется по сравнению с контролем. Только при введении

комплекса ЕПМД наблюдается некоторое возрастание NQR-активности по сравнению с контрольной группой и группой животных, которым вводили доксорубин (табл. 4).

Таблица 4.

НАДН-КоQ-оксидоредуктазная, сукцинат-КоQ-оксидоредуктазная и цитохромоксидазная активности в митохондриях сердца животных при введении доксорубицина и комплексов предшественников и модуляторов биосинтеза КоQ ($M \pm m$, $n=6$).

Группы	NQR, ммоль НАДН в 1 мин на 1 мг белка	SQR, ммоль сукцината в 1 мин на 1 мг белка	Цитохромоксидазная активность, мкмоль цитохрома c в 1 час на 1 мг белка
Контроль	4,86±0,11	14,90±0,24	4,97±0,07
Доксорубицин	5,18±0,41	7,76±0,87*	3,12±0,16*
Доксорубицин + ЕПМ	5,47±0,42	26,32±1,43*#	4,01±0,69*
Доксорубицин + ЕПМД	5,61±0,26*	24,92±2,79*#	3,31±0,21*

*Примечание: * – разница достоверна по сравнению с контролем, # – разница достоверна по сравнению с группой животных, которым вводили доксорубицин, $p \leq 0,05$.*

SQR-активность в митохондриях сердца при введении доксорубицина снижается (табл. 4). Учитывая тот факт, что содержание КоQ в митохондриях сердца повышается, а SQR-активность снижается, очевидно, часть пула КоQ недоступна для данного ферментного комплекса. Другой возможной причиной снижения активности ферментного комплекса может быть окислительное повреждение мембранных структур или компонентов самой ферментной системы. При введении комплексов ЕПМ и ЕПМД наблюдается повышение SQR-активности.

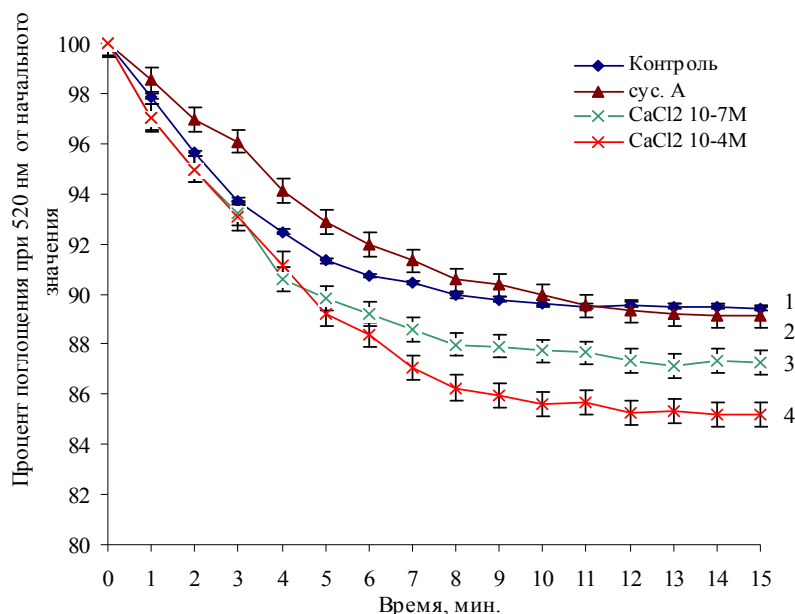
Цитохромоксидазная активность в митохондриях сердца также снижается при введении доксорубицина (табл. 4). Эти изменения могут привести к нарушению процесса транспорта восстановленных эквивалентов в цепи транспорта электронов в

митохондриях и, в результате, к угнетению процесса дыхания. Только при параллельном введении животным доксорубицина и комплекса ЕПМ наблюдается некоторое повышение цитохромоксидазной активности, при введении комплекса ЕПМД цитохромоксидазная активность остается на низком уровне.

Окислительное повреждение митохондрий и нагрузка кальцием – процессы, которые связаны с токсичностью доксорубицина, являются мощными индукторами неспецифической проницаемости митохондрий [27]. В наших исследованиях наблюдается возрастание чувствительности mPTP к действию индукторов ее открытия – Ca^{2+} и ФАО, в митохондриях сердца по сравнению с контролем (рис. 2, 3).

Рисунок 2.

Степень набухания митохондрий сердца животных в контроле ($M \pm t$, $n=6$).



Примечание:

1 – митохондрии сердца;

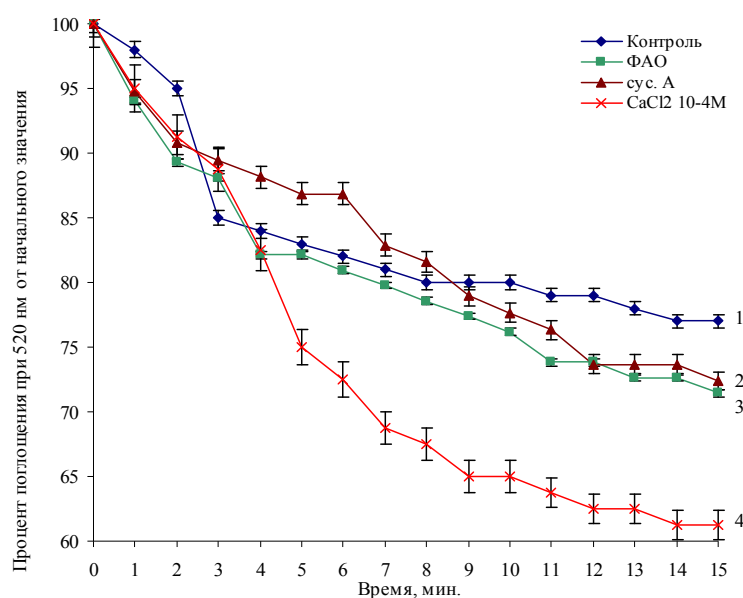
2 – преинкубация митохондрий сердца с циклоспорином А (10^{-5} моль/л), действие Ca^{2+} (10^{-4} моль/л);

3 – митохондрии сердца, действие Ca^{2+} (10^{-7} моль/л);

4 – митохондрии сердца, действие Ca^{2+} (10^{-4} моль/л).

Рисунок 3.

Степень набухания митохондрий сердца животных при введении доксорубицина ($M \pm t$, $n=6$).



Примечание:

1 – митохондрии сердца;

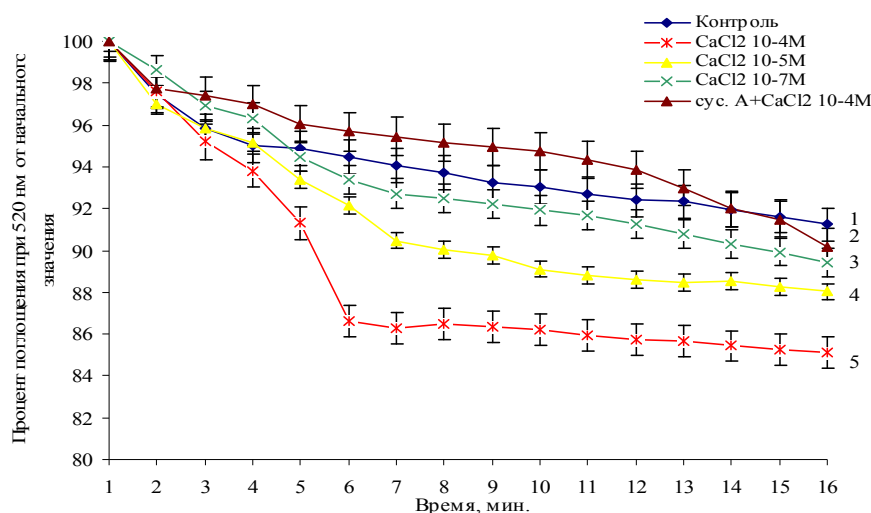
2 – преинкубация митохондрий сердца с циклоспорином А (10^{-5} моль/л), действие Ca^{2+} (10^{-4} моль/л);

3 – митохондрии сердца, действие ФАО (10^{-4} моль/л);

4 – митохондрии сердца, действие Ca^{2+} (10^{-4} моль/л).

Рисунок 4.

Степень набухания митохондрий сердца животных при введении доксорубицина и комплекса ЕПМ ($M \pm m$, $n=6$).

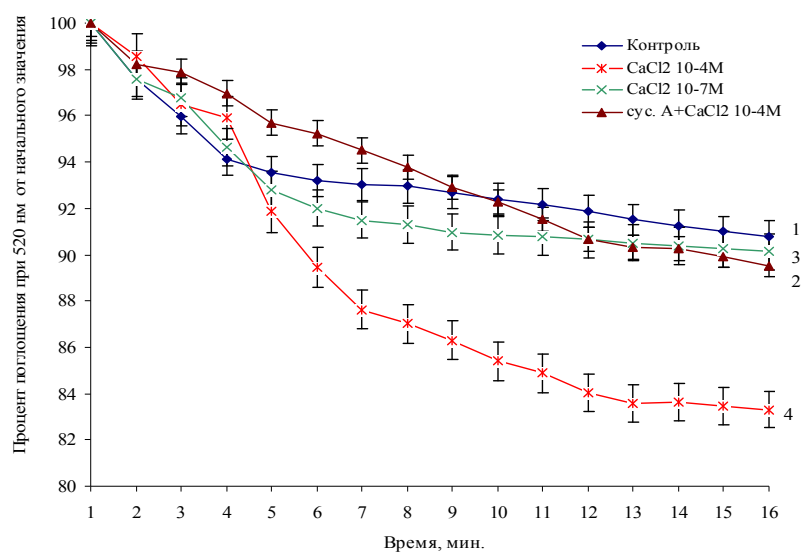


Примечание:

- 1 – митохондрии сердца;
- 2 – преинкубация митохондрий сердца с циклоспорином А (10^{-5} моль/л), действие Ca^{2+} (10^{-4} моль/л);
- 3 – митохондрии сердца, действие Ca^{2+} (10^{-7} моль/л);
- 4 – митохондрии сердца, действие Ca^{2+} (10^{-5} моль/л);
- 5 – митохондрии сердца, действие Ca^{2+} (10^{-4} моль/л).

Рисунок 5.

Степень набухания митохондрий сердца животных при введении доксорубицина и комплекса ЕПМД ($M \pm m$, $n=6$).



Примечание:

- 1 – митохондрии сердца;
- 2 – преинкубация митохондрий сердца с циклоспорином А (10^{-5} моль/л), действие Ca^{2+} (10^{-4} моль/л);

3 – митохондрии сердца, действие Ca^{2+} (10^{-7} моль/л);

4 – митохондрии сердца, действие Ca^{2+} (10^{-4} моль/л).

При введении животным комплексов ЕПМ и ЕПМД наблюдается уменьшение величины набухания митохондрий сердца за счет открытия mPTP под действием индукторов ее открытия – ФАО и Ca^{2+} (рис. 4, 5). Установлено, что Ca^{2+} в диапазоне исследуемых концентраций 10^{-7} – 10^{-4} моль/л вызывает набухание митохондрий в сердце животных, которым вводили вместе с доксорубицином комплексы ЕПМ и ЕПМД (рис. 4, 5).

В работе [27] делают предположение, что в митохондриях сердца животных, которым вводили доксорубицин, возрастает количество окисленных тиоловых остатков в белках комплекса mPTP, что может быть существенным фактором возрастания кальций-индуцируемой чувствительности mPTP у этих животных. Изменения содержания и редокс-состояния митохондриальных антиоксидантов также может быть важным фактором регуляции состояния mPTP. В условиях окислительного стресса критические тиоловые группы белков комплекса mPTP хуже защищены от воздействия АМК, которые возникают при окислительно-восстановительных преобразованиях доксорубицина.

Полученные результаты свидетельствуют о развитии митохондриальной дисфункции при воздействии доксорубицина в митохондриях сердца подопытных животных, и, в частности, повышение чувствительности mPTP к индукторам её открытия – Ca^{2+} и ФАО – и, соответственно, возрастание проапоптотических свойств кардиомиоцитов у животных, которым вводили доксорубицин, по сравнению с

животными контрольной группы. Введение животным параллельно с доксорубицином комплексов предшественников и модуляторов биосинтеза КоQ приводит к коррекции величин данных показателей.

Заключение.

В работе был исследован уровень и функциональная активность КоQ при адреналин- и доксорубицин-индуцированном повреждении сердца, которое сопровождается развитием митохондриальной дисфункции. Полученные результаты свидетельствуют об эффективности комплексов предшественников и модуляторов биосинтеза КоQ для коррекции митохондриальной дисфункции. В частности, наблюдается нормализация содержания КоQ, витамина Е, активности комплексов I, II и IV цепи транспорта электронов в митохондриях сердца.

При адреналин- и доксорубицин-индуцированном повреждении сердца наблюдается возрастание чувствительности митохондриальной поры переходной проницаемости к действию индукторов её открытия – Ca^{2+} и ФАО, что может приводить к увеличению проницаемости митохондриальной мембраны в тканях сердца. При введении животным комплексов ЕПМ и ЕПМД наблюдается снижение чувствительности митохондриальной поры переходной проницаемости к воздействию Ca^{2+} и ФАО (на 50–90 %).

Представленные в работе экспериментальные данные открывают перспективу создания новых патогенетически обоснованных подходов и средств для профилактики и лечения метаболических нарушений при сердечно-сосудистых патологиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Archer S. L.** The mitochondrion as a Swiss army knife: implications for cardiovascular disease // *J. Mol. Med.* – 2010. – Vol. 88, N 10. – Pp. 963–965.
2. **Frohman M. A.** Mitochondria as integrators of signal transduction and energy production in cardiac physiology and disease // *J. Mol. Med.* – 2010. – Vol. 88, N 10. – Pp. 967–970.
3. **Мазунин И.О.** Современные представления о структуре и функциях митохондрий // *Генетика.* – 2010. – Т. 46. – № 9. – С. 1241–1243.
4. **Rosca M. G., Hoppel C. L.** Mitochondria in heart failure // *Cardiovasc. Res.* – 2010. – Vol. 88, N 1. – Pp. 40–50.
5. **Mammucari C., Rizzuto R.** Signaling pathways in mitochondrial dysfunction and aging // *Mech. Ageing Dev.* – 2010. – Vol. 131, N 7–8. – Pp. 536–543.
6. **Turunen M., Swiezewska E., Chojnacki T., Sindelar P., Dallner G.** Regulatory aspects of coenzyme Q metabolism // *Free Radical Research.* – 2002. – Vol. 36. – Pp. 437–443.
7. **Inal M., Dokumacioglu A., Ozcelik E., Ucar O.** The effects of ozone therapy and coenzyme Q(10) combination on oxidative stress markers in healthy subjects // *Ir. J. Med. Sci.* – 2011. – Vol. 180, N 3. – Pp. 703–707.
8. **Sohal R. S., Forster M. J.** Coenzyme Q, oxidative stress and aging // *Mitochondrion.* – 2007. – N 7S. – Pp. S103–S111.
9. **Wang Y., Hekimi S.** Molecular genetics of ubiquinone biosynthesis in animals // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* – 2013. – Vol. 48, N 1. – Pp. 69–88.
10. **Донченко Г.В., Кучменко О.Б., Петухов Д.М.** Біохімічні властивості і функціональна роль убіхінону (Q). Практичні аспекти застосування // *Укр. біохім. журн.* – 2005. – Т. 70, № 5. – С. 24 – 36.
11. **Андреев С.В.** Моделирование заболеваний. – М., 1973. – С. 198 – 223.
12. **Капелько В.И., Хаткевич А.Н., Дворянцев С.Н.** Сократительная функция и энергетический метаболизм сердца на ранней стадии адриамициновой кардиомиопатии // *Кардиология.* – 1997. – № 2. – С. 31 – 35.
13. **Muhammed H., Kupur C. K. R.** Influence of ubiquinone on the inhibitory effect of adriamycin on mitochondrial oxidative phosphorylation // *Biochem J.* – 1984. – Vol. 217. – Pp. 493–498.
14. **Патент 82639, Україна, А61K31/355** Комплексний препарат для підвищення внутрішньоклітинного енергетичного обміну в організмі / Донченко Г. В., Кузьменко І. В., Кучменко О. Б., Петухов Д. М.; заяв. 26.09.2006, опубл. 25.04.2008. Бюл. №8, 7 с.
15. **Костерин С. А., Браткова Н. Ф., Курский М. Д.** Роль сарколеммы и митохондрий в обеспечении кальциевого контроля расслабления миомерия // *Биохимия.* – 1985. – Т. 50, № 8. – С. 1350–1361.
16. **Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.** Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193, N 1. – Pp. 265–275.
17. **Донченко Г. В., Коваленко В. Н., Забарная Е. Н.** Действие производных α -токоферола на содержание природных хинонов в тканях витамин Е-недостаточных крыс // *Биохимия.* – 1979. – Т. 44, вып.5. – С. 923–930.
18. **Hatefi Y., Rieske J. S.** Preparation and properties of DPNH-coenzyme Q reductase (Complex I of the Respiratory Chain) // *Methods in Enzymology.* – 1967. – Vol. 10. – Pp. 235–239.
19. **Ziegler D., Rieske J. S.** Preparation and properties of succinate dehydrogenase-coenzyme Q reductase (complex II) // *Methods in Enzymology.* – 1967. – V. 10. – Pp. 231–235.

20. Гулидова Г.П., Сорокина И.Н. Некоторые условия спектрофотометрического определения активности сукцинатдегидрогеназы и цитохромоксидазы в митохондриях мозга // Бюлл. эксп. биол. и мед. – 1967. – 63, № 1. – С. 41–44.
21. Сагач В.Ф., Вавилова Г.Л., Струтинська Н.А., Рудик О.В. Старіння підвищує чутливість до індукторів мітохондріальної пори в серці щурів // Фізіологічний журн. – 2004. – Т. 50, № 2. – С. 49 – 63.
22. Василенко В.Х., Фельдман С.Б., Хитров Н.И. Миокардиодистрофия. – М.: Медицина, 1989. – 272 с.
23. Лукьянова Л.Д. Биоэнергетическая гипоксия: понятие, механизмы и способы коррекции // Бюл. экпер. биол. и мед. – 1997. – Т. 124, № 9. – С.244 – 254.
24. Sugawara H., Yamamoto T., Shimizu S., Momose K. Inhibition of ubiquinone synthesis in isolated rat heart under an ischemic condition // Int. Biochem. – 1990. – Vol. 25, N 5. – Pp. 477–480.
25. Li T., Singal P.K. Adriamycin-induced early changes in myocardial antioxidant enzymes and their modulation by probucol // Circulation. – 2000. – Vol. 102, N 17. – Pp. 2105–2110.
26. Ватугин М.Т., Калинкина Н.В., Кетинг Е.В. Антрациклиновая кардиомиопатия. – Донецк: ДонДІШІ, 2001. – 236 с.
27. Оливьера П. Дж., Сантос М. С., Уэллас К. В. Тиолзависимые изменения неспецифической проницаемости и дыхания митохондрий, вызываемые доксорубицином // Биохимия. – 2006. – Т. 71, Вып. 2. – С. 247–253.

© O. B. Kuchmenko

UDC 577.161.6 + 579.61

BIOCHEMICAL PROPERTIES OF UBIQUINONE FUNCTION UNDER EXPERIMENTAL PATHOLOGICAL CONDITIONS OF CARDIOVASCULAR SYSTEM*

O. B. Kuchmenko (Kiev, Ukraine)

The aim of this project was to study the state of mitochondrial electron-transport chain components, CoQ content and sensitivity of mitochondrial permeability transition pore in rat heart mitochondria under treatment with adrenaline, doxorubicin, and complexes of modulators and precursors of CoQ biosynthesis.

Subsequent application of complexes of precursors and modulators of ubiquinone biosynthesis under the adrenaline treatment decreases in sensitivity of mitochondrial permeability transition pore to inductors of its opening, improves activities of the mitochondrial electron-transport chain complexes I, II and IV. These complexes can act as effective anti-hypoxic remedies that promote normalization of the energy metabolism in heart. In the series of studies on rats treated with doxorubicin the administration of complexes of precursors and modulators of ubiquinone biosynthesis leads to significant decrease sensitivity of mitochondrial permeability transition pore to inductors of its opening and normalization of mitochondrial electron-transport chain function, which may lead to notable reduction of doxorubicin toxicity. The experimental data obtained may become the basis of development of approaches to correction of adverse effects of doxorubicin by treatment with the complexes of precursors and modulators of its biosynthesis. These data may be used to substantiate the application of these biologically active substances within frameworks of complex treatment of cardiovascular pathologies.

Key words: ubiquinone, mitochondria, adrenaline, doxorubicin, mitochondrial permeability transition pore.

REFERENCES

1. **Archer S. L.** The mitochondrion as a Swiss army knife: implications for cardiovascular disease // J. Mol. Med. 2010. vol. 88(10). pp. 963–965.
2. **Frohman M. A.** Mitochondria as integrators of signal transduction and energy production in cardiac physiology and disease // J. Mol. Med. 2010. vol. 88(10). pp. 967–970.
3. **Mazunin I. O.** Modern concepts of the mitochondrial structure and functions // Genetika. 2010. vol. 46(9). pp. 1241–1243. [In Russia]
4. **Rosca M. G., Hoppel C. L.** Mitochondria in heart failure // Cardiovasc. Res. 2010. vol. 88(1). pp. 40–50.
5. **Mammucari C., Rizzuto R.** Signaling pathways in mitochondrial dysfunction and aging // Mech. Ageing Dev. 2010. vol. 131(7–8). pp. 536–543.
6. **Turunen M., Swiezewska E., Chojnacki T., Sindelar P., Dallner G.** Regulatory aspects of coenzyme Q metabolism // Free Radical Research. 2002. vol. 36. pp. 437–443.

7. **Inal M., Dokumacioglu A., Ozcelik E., Ucar O.** The effects of ozone therapy and coenzyme Q(10) combination on oxidative stress markers in healthy subjects // *Ir. J. Med. Sci.* 2011. vol. 180(3). pp. 703–707.
8. **Sohal R. S., Forster M. J.** Coenzyme Q, oxidative stress and aging // *Mitochondrion*. 2007. 7S. pp. S103–S111.
9. **Wang Y., Hekimi S.** Molecular genetics of ubiquinone biosynthesis in animals // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2013. vol. 48(1). pp. 69–88.
10. **Donchenko G. V., Kuchmenko O. B., Petukhov D. M.** Biochemical properties and functional role of ubiquinone (CoQ). Aspects of practical use // *Ukr. Biokhim. Zh.* 2005. vol. 70(5). pp. 24–36. [In Ukraine]
11. **Andreev S. V.** The models of diseases. Moscow: Medicine 1973. pp. 198–223. [In Russia]
12. **Kapel'ko V. I., Khatkevych A. N., Dvoryantsev S. N.** Heart contractile function and energy metabolism during early stages of Adriamycin cardiomyopathy // *Kardiologiya*. 1997. vol. 2. pp. 31–35. [In Russia]
13. **Muhammed H., Kupur C. K. R.** Influence of ubiquinone on the inhibitory effect of adriamycin on mitochondrial oxidative phosphorylation // *Biochem. J.* 1984. vol. 217. pp. 493–498.
14. **Patent 82639, Ukraine, A61K31/355** Complex preparation for improving the intracellular metabolism / Donchenko G. V., Kuz'menko I. V., Kuchmenko O. B., Petukhov D. M.; заяв. 26.09.2006, publ. 25.04.2008. Bull. №8, 7 p. [In Ukraine]
15. **Kosterin S. A., Bratkova N. F., Kurskii M. D.** The role of sarcolemma and mitochondria in calcium-dependent control of myometrium relaxation // *Biokhimiia (Mosc)*. 1985. vol. 50(8). pp. 1350–1361. [In Russia]
16. **Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.** Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* 1951. vol. 193(1). pp. 265–275.
17. **Donchenko G. V., Kovalenko V. N., Zabarnaia E. N.** Effects of alpha-tocopherol derivatives on natural quinone levels in the tissues of vitamin E deficient rats // *Biokhimiia (Mosc)*. 1979. vol. 44(5). pp. 923–930. [In Russia]
18. **Hatefi Y., Rieske J. S.** Preparation and properties of DPNH-coenzyme Q reductase (Complex I of the Respiratory Chain) // *Methods in Enzymology*. 1967. vol. 10. pp. 235–239.
19. **Ziegler D., Rieske J. S.** Preparation and properties of succinate dehydrogenase-coenzyme Q reductase (complex II) // *Methods in Enzymology*. 1967. vol. 10. pp. 231–235.
20. **Gulidova G. P., Sorokina I. N.** Various conditions for spectrophotometric determination of succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase activity in cerebral mitochondria // *Biull. Eksp. Biol. Med.* 1967. vol. 63(1). pp. 41–44. [In Russia]
21. **Sagach V. F., Vavilova G. L., Strutinskaya N. A., Rudyk O. V.** Aging increases the sensitivity of mitochondrial permeability transition pore to inductors of its opening in rats' heart // *Fiziol. Zh.* 2004. vol. 50(2). pp. 49 – 63. [In Ukraine]
22. **Vasilenko V. H., Fel'dman S. B., Khitrov N. I.** Myocardiodystrophy. Moscow: Medicine, 1989. In Russia.
23. **Luk'ianova L.D.** Bioenergetic hypoxia: definition, mechanisms, and methods of correction // *Biull. Eksp. Biol. Med.* 1997. vol. 124(9). pp. 244–254. [In Russia]
24. **Sugawara H., Yamamoto T., Shimizu S., Momose K.** Inhibition of ubiquinone synthesis in isolated rat heart under an ischemic condition // *Int. Biochem.* 1990. vol. 25(5). pp. 477–480.
25. **Li T., Singal P. K.** Adriamycin-induced early changes in myocardial antioxidant enzymes and their modulation by probucol // *Circulation*. 2000. vol. 102(17). pp. 2105–2110.

26. **Vatutin M.T., Kalinkina N.V., Keting E.B.** Anthracycline cardiomyopathy. Donetsk: DonDISHI, 2001. [In Russia]
27. **Oliveira P.J., Santos M.S., Wallace K.B.** Doxorubicin-induced thiol-dependent alteration of cardiac mitochondrial permeability transition and respiration // Biochemistry (Mosc). 2006. vol. 71(2). pp. 247–253. [In Russia]

Kuchmenko Olena – doctor of biological sciences, docent, Department of biomedical and valeological basics of life and health, Dragomanov National Pedagogical University.

E-mail: kuchmeb@yahoo.com

© О. У. Муротов, У. К. Ибрагимов

УДК 616.36 + 008.51 + 053

ЛЕЧЕНИЕ АНТИОКСИДАНТОМ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИНСУЛЬТА: МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ТКАНЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА*

О. У. Муротов, У. К. Ибрагимов (Ташкент, Узбекистан)

Минимальное нахождение комплексов взаимодействия нейрональных клеток с мечеными Bcl-2 крысиными клетками при морфологическом и гистоиммунологическом исследовании височных долей головного мозга крыс при экспериментальном ишемическом инсульте без лечения свидетельствует о неоспоримом отсутствии процессов апоптоза. Лишь единичные нейроны, которые проявили положительную реакцию с Bcl-2 клетками и были индуцированы в процесс апоптоза, что не является доказательством того, что данные клетки завершат начавшийся процесс и не будут ввергнуты в процессы некроза. Церебролизин будучи антиоксидантом белковой природы обладает пролонгированным действием, тогда как эмоксипин – антиоксидант малой молярной массой оказывает позитивный эффект в ранние сроки экспериментального инсульта.

Ключевые слова: антиоксиданты, эмоксипин, церебролизин, экспериментальный инсульт

Вопросы нейротрофичности, нейропротекции и нейропластичности, их связь с морфологией регенераторных процессов занимает центральное место в проблеме структурных основ адаптации организма к внешним воздействиям и компенсации нарушенных функций.

Накопленные за последние десятилетия данные привели к полной реструктуризации и реорганизации знаний в этой области и к иному пониманию функционирования нервной системы [2].

* Статья подготовлена по результатам работы Международной научно-практической конференции «Свободные радикалы и антиоксиданты в химии, биологии и медицине» (1-4 октября 2013 г.) в рамках реализации Программы стратегического развития ФГБОУ ВПО «Новосибирский государственный педагогический университет» на 2012–2016 гг.

Муротов Облокул Уматович – ассистент кафедры гистологии, Ташкентский педиатрический медицинский институт.

E-mail: uk_ibragimov@rambler.ru

Ибрагимов Уткур Кудратович – доктор медицинских наук, профессор кафедры биохимии, Ташкентский педиатрический медицинский институт

E-mail: uk_ibragimov@rambler.ru

Исследования биохимических и морфологических процессов раскрывающих фундаментальные биологические процессы, происходящие в нервной системе которые вызывают клеточную смерть, и основные аспекты терапевтического контроля являются приоритетными.

Нейротрофичность – естественный процесс, который выражается в пролиферации, миграции, дифференциации и выживании нервных клеток. Нейропротекцию определяют как непрерывную адаптацию нейрона к новым функциональным условиям, и представляют как сумму всех механизмов, направленных против действия повреждающих факторов. Нейропластичность включает в себя восстановление функций после естественных повреждений и других нарушений, вызванных любыми агентами. Эти три фундаментальных биологических процесса не имеют четко выраженных границ. Они накладываются и смешиваются друг с другом. Каждый из них имеет две стороны: абсолютную и относительную. Абсолютные механизмы преимущественно контролируются нейротрофическими факторами и нейротрофноподобными молекулами, а относительные связаны с блокаторами ионных каналов, агонистами и антагонистами определенных рецепторов, ловушками свободных радикалов, хелаторами металлов и др. процессы, вызывающие нарушение функционирования клетки и ее смерть, совпадают. Материалы и методы исследования. Исследования проведены на белых беспородных крысах самцах, исходной массой 120-130 грамм. Модель ишемии головного мозга воспроизводилась методом клипирования левой сонной артерии на протяжении 40 мин. В качестве контроля служили животные «ложнооперированные»,

которым вскрывали общую сонную артерию под эфирным наркозом с последующим послойным ушиванием (n=6). Забой животных проводили в сроки 1,3,6,12,24,72 часа после реперфузии.

Для коррекции пост-ишемических изменений головного мозга использовали эмоксипин (2-группа, производство Россия) и церебролизин (3-группа производство Австрия, ABEWE). Верификацию ишемии проводили на основании морфологических исследований (окраска нитратом серебра по методу Ниссля [1]. Полученные результаты и обсуждение. Ишемические процессы в ткани мозга сопровождаются отеком мозга. Моментом, «запускающим» развитие отека, является проникновение в нейроны воды из экстрацеллюлярного пространства, так называемое набухание и размытость нейрональных клеток, обусловленное нарушением мембранной проницаемости. Набухание клеток вызывает интрацеллюлярный отек, затем к нему присоединяется экстрацеллюлярный (вазогенный) отек из-за нарушения ГЭБ и накопления в поврежденной зоне недоокисленных продуктов, образующихся в условиях анаэробного гликолиза. Следует, прежде всего, отметить, что повреждение клеток выявляется не одновременно с началом кислородного голодания. Это не означает, что морфологические изменения «отстают» во времени от биохимических, физиологических и клинических проявлений кислородного голодания нейронов. При морфологическом исследовании начальных проявлений ишемического инсульта, который характеризовался снижением мозгового кровотока левой височной доли, гистологически регистрировалась первичная реакция, или появлялась так называемая маргинальная зона ишемии, которая в сумме

морфологических критериев была расценена нами как характеристика торможения синтеза белков в нейронах, возможно компенсаторного генеза. Впоследствии снижение мозгового кровотока стимулировало анаэробный гликолиз, что проявлялось образованием в области динамических метаболических изменений, зоны «ишемической полутени» – пенумбра, изменениям в которой мы придавали особое значение, так как состояние пенумбры является прогностическим критерием дальнейшей динамики развивающихся процессов. В структурах головного мозга при этом происходят только функциональные изменения, а морфологических изменений не наступает. Длительность существования пенумбры 3–6 часов. Это временные границы «терапевтического окна» – периода, на протяжении которого лечебные мероприятия наиболее перспективны и могут ограничить объем инфаркта. Окончательное формирование инсульта завершается через 48–56 часов. Не все нейроны при ишемических повреждениях страдают одинаково в равной степени. Так нами отмечено, что верхние слои коры были более чувствительны к гипоксии, чем нижние, заметно поражаются клетки III и IV или клетки III и V слоев коры. Это может объясняться в первую очередь тем, что слои коры, имеют различную между собой степень васкуляризации, а так же различаются по активности многих ферментов энергетического обмена. Различные типы нейронов так же повреждаются неравномерно. Так нами отмечено, что пирамидные клетки страдают меньше, вовлекаются в процесс медленнее и сохраняются дольше по сравнению со звёздчатыми нейронами. Так нами отмечено, что в популяции нервных клеток к 3 часам

влияния эмоксипина в данной группе прослеживались начальные явления хроматолиза и появление единичных участков клеточного разряжения в группе с эмоксипином. В отличие от чего в группе с церебролизином на первый план выступали признаки повышения сосудистой проницаемости – перикапиллярный отек, стаз, сладж и дилатация капилляров которые являлись отличительными признаками первых часов. Сами нейроны по истечении 6-ти часов после окклюзии увеличивались в размерах, становились более округлыми, полихроматофильными. Большинство нейронов становилось бледно окрашенными с нечёткими клеточными границами, другие проявляли выраженность гиперхроматоза с последующей тенденцией к сочетанию гиперхроматоза и вакуолизацией, а так же сочетания гиперхроматоза с элементами гомогенизации цитоплазмы. В любой клетке заложена генетически обусловленная программа, позволяющая при возникновении генетической мутации включить программу самоликвидации, апоптоза. Апоптоз являясь фундаментальным биологическим процессом, необходим для удаления старых повреждённых и инфицированных клеток, с генетическими повреждениями, а так же играет роль в удаления избытка клеток, особенно в нервной и иммунной системе [4]. Процесс апоптоза подразделяют структурно на три независимые фазы: инициация, эффекторная фаза и деградация [6]. Центральным компонентом системы контроля за апоптозом является белок p53, именно на нём сходятся многообразные сигналы, сообщающие о возникновении «нештатной ситуации» и запускается ряд внутриклеточных процессов ведущих к самоубийству клетки [3]. Белок p53 является маркёром, эффекторной фазы и фазы

деградации, т.е. неотвратимой клеточной смерти и является триггером апоптоза. В свою очередь, первым обнаруженным белком, регулирующим апоптоз явился Bcl-2, затем было выявлено целое семейство Bcl-2-генов которые угнетают апоптоз или являются его индукторами. Белок, кодируемый Bcl-2, является интегральным мембранным протеином, который локализован в мембранах клетки. Этот белок защищает клетки от программированной клеточной смерти и имеет онкогенный эффект, так как снижает апоптоз [3]. К сожалению, специфических реакций взаимодействия меченных белком р53 клеток и нейронов ни в одной из исследуемых групп нам не удалось выявить, так как время максимальной индукции апоптоза варьирует для разных клеток, и зависит, по-видимому, от их чувствительности к апоптотическому сигналу, а так же от метода тестирования апоптоза. Различие морфологических и гистоиммунологических реакций в исследуемых тканях, обусловлены фармакологической разностью церебролизина и эмоксипина. Церебролизин является освобождённым от белка гидролизатом содержащим все основные аминокислоты (в том числе предшественники нейромедиаторов), а так же другие компоненты, в частности γ -аминомасляную кислоту, за счёт чего, возможно наиболее дольше вступает в реакции взаимодействия. В отличие от церебролизина, эмоксипин принадлежащий к классу 3-оксипиридинов, структурных аналогов витамина B6, будучи низкомолекулярным антиоксидантом, фармакологические свойства которого обусловлены способностью ингибирования фосфодиэстеразы, свободнорадикального окисления, агрегации тромбоцитов, полимеризацией фибрина, и что наиболее

важно в нашем случае высокой активностью стабилизации структур и функций клеточных мембран, что проявилось в проведённых нами экспериментальных исследованиях резко выраженными интенсивными морфологическими проявлениями комплекса вышеупомянутых свойств только на начальных этапах патологии с последующим «бессилием» к удержанию очередных стадий острого ишемического стресса. В исследуемой группе морфологических и гистоиммунологических событий височных долей крыс при лечении эмоксипином после экспериментального ишемического инсульта головного мозга крыс выявлена ранняя морфологическая динамика резкого отграничения и сужение зоны ишемической пенумбры и начальные проявления гистоиммунологической реакции с чёткими проявлениями только лишь на 3-и сутки. Данное мы расценили как «запоздалую реакцию» рецепторного аппарата контролирующего апоптоз, в результате чего запустившиеся и активно развивающиеся процессы первых часов оказываются упущенными и уже динамика происходящих процессов диктует отрицательный результат в виде преобладания некротических процессов и процессов нейромалации к концу эксперимента. Изучение морфологических и гистоиммунологических процессов в височных долях крыс при лечении церебролизинем после экспериментального ишемического инсульта головного мозга крыс отразило раннюю реактивность исследуемой ткани с мечеными Bcl-2 и р53 клетками. Яркая картина раннего взаимодействия, начиная с 3-6 часов, и бурная стадийность происходящих гистоиммунологических процессов и некоторая «замаскированность» при этом морфологических процессов, ещё раз

подчеркнули важность вопроса изучения процессов апоптоза и некроза их общие начальные пусковые механизмы стадийность и взаимопереход на начальных этапах, которые невозможно рассматривать не во взаимосвязи с естественной морфологией острой ишемии головного мозга и воспалительных процессов. Именно поэтому в своей работе мы придерживались принципа комплексного морфологического исследования нативной ткани мозга и в сочетании с мечеными моноклональными клетками. Выводы. Минимальное нахождение комплексов взаимодействия нейрональных клеток с мечеными Bcl-2 крысиными клетками при морфологическом и гистоиммунологическом исследовании

височных долей головного мозга крыс при экспериментальном ишемическом инсульте без лечения свидетельствует о неоспоримом отсутствии процессов апоптоза. Лишь единичные нейроны, которые проявили положительную реакцию с Bcl-2 клетками и были индуцированы в процесс апоптоза, что не является доказательством того, что данные клетки завершат начавшийся процесс и не будут ввергнуты в процессы некроза. Церебролизин будучи антиоксидантом белковой природы обладает пролонгированным действием, тогда как эмоксипин – антиоксидант с малой молярной массой оказывает позитивный эффект в ранние сроки экспериментального инсульта.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Пирс Э.** Гистохимия. – М., 1962. – 648 с.
2. **Muresanu D. F.** Neurotrophic factors. – Bucuresti: Libripres, 2003. – 268p.
3. **Ergashev J. D., Sigatullina M. I., Ibragimov U.K.** Neuropsychic growth of children with hypoxi – ischemic encephalopathy // The 2th World Congress of Neonatology. – 6th – 9th January, 2010, – Luxor, Egypt. – p.19.
4. **Ibragimov U. K.** Hypoxi-ishemic encephalopathy in children //The 2th World Congress of Neonatology. -6th – 9th January, 2010. – Luxor, Egypt. – p.18.
5. **Sloviter R.** Apoptosis: a guide for perplexed // Trends Pharmacol Sci. – 2002. – Vol. 23. – pp. 19–24.
6. **Ибрагимов У. К., Хайбуллина З. Р.** Апоптоз. Учебное пособие. – Ташкент. – 2007. – 81 с.

© O. U. Murotov, U. K. Ibragimov

UDC 616.36 + 008.51 + 053

**THE TREATMENT WITH ANTIOXIDANT DRUGS OF EXPERIMENTAL STROKE:
MORPHOLOGICAL CHANGES IN TISSUE OF BRAIN***O. U. Murotov, U. K. Ibragimov (Tashkent, Uzbekistan)*

The minimum finding complex interactions neuronal hatches with complexes Bcl-2 rat hatches under morphological and histoimmunological study of the cerebrum of the rats under experimental stroke without treatment is indicative of unchallengeable absence of the processes apoptosis. Only single neurons, which have shown the positive reaction with Bcl-2 hatches and were indicured in process apoptosis that is not proof that that hatch data terminate; complete begun process and will not be started in processes of the necrosis. Cerebrolizin being antioxidant protein nature possesses the prolonged action then amoxipin – antioxidant small molar by mass renders the positive effect at early period's experimental stroke.

Keywords: *antioxidant, amoxipin, cerebrolizin, experimental stroke.*

REFERENCES

1. **Pirs E.** Histochemistry. – M., 1962. – 648 p.
2. **Muresanu D. F.** Neurotrophic factors. – Bucuresti: Libripress, 2003. – 268p.
3. **Ergashev J. D., Sigatullina M. I., Ibragimov U. K.** Neuropsychic growth of children with hypoxi – ischemic encephalopathy // The 2th World Congress of Neonatology. – 6th – 9th January, 2010, – Luxor, Egypt. – p.19.
4. **Ibragimov U. K.** Hypoxi-ishemic encephalopathy in children //The 2th World Congress of Neonatology. -6th – 9th January, 2010. – Luxor, Egypt. – p.18.
5. **Sloviter R.** Apoptosis: a guide for perplexed // Trends Pharmacol Sci. – 2002. – Vol. 23. – pp. 19–24.
6. **Ibragimov U. K., Haibullina Z. R.** Apoptosis. The Manual. – Tashkent. – 2007. – 81 p.

Murotov Oblokul Ummatovich – the assistant to faculty of histology, Tashkent pediatric medical institute.

E-mail: uk_ibragimov@rambler.ru

Ibragimov Utkur Kudratovich – the doctor of medical sciences, the professor of faculty of Biochemistry, Tashkent Pediatric Medical Institute

E-mail: uk_ibragimov@rambler.ru

© Л. Е. Панин, П. В. Мокрушников

УДК 538.9 + 577.352.332/.335 + 577.175.5 + 577.31

ВОЗДЕЙСТВИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДНЫХ ВИТАМИНА Е НА РЕОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭРИТРОЦИТАРНЫХ МЕМБРАН*

Л. Е. Панин, П. В. Мокрушников (Новосибирск, Россия)

Методами флуоресцентного анализа исследовалось влияние синтетических производных витамина Е тиофана и тиофана-М на реологические свойства мембран эритроцитов. Первый препарат снижал микровязкость как в области липид-липидных, так и белок-липидных взаимодействий. Вторым препаратом снижал микровязкость в области белок-липидных взаимодействий и повышал в области липид-липидных взаимодействий. Проверка эффективности антиоксидантной защиты эритроцитарных мембран показала, что тиофан значительно подавляет перекисное окисление липидов мембран и образование белково-липидных сшивок, восстанавливая реологические свойства эритроцитов. Данный препарат рекомендован нами для профилактики перекисного окисления липидов у лиц, работающих в условиях Арктики.

Ключевые слова: микровязкость мембран, перекисное окисление липидов, тиофан.

Биологические мембраны – это жидкокристаллические структуры. Выполнение ими различных функций (транспорт газов через мембрану, рецепция гормонов, активация мембраносвязанных ферментов и др.) обусловлено обратимыми наноструктурными и структурно-фазовыми переходами [1–2]. Старение мембран связано с

накоплением в них необратимых структурных изменений. Большой вклад в этот процесс вносит перекисное окисление ненасыщенных связей жирных кислот фосфолипидов и образование белково-липидных сшивок. Перекисное окисление липидов значительно усиливается под влиянием колебаний магнитного поля Земли

* Статья подготовлена по результатам работы Международной научно-практической конференции «Свободные радикалы и антиоксиданты в химии, биологии и медицине» (1-4 октября 2013 г.) в рамках реализации Программы стратегического развития ФГБОУ ВПО «Новосибирский государственный педагогический университет» на 2012–2016 гг.

Панин Лев Евгеньевич – доктор медицинских наук, академик российской академии медицинских наук, директор, научно-исследовательский институт биохимии СО РАМН.

E-mail: panin@soramn.ru

Мокрушников Павел Валентинович – кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии клетки, научно-исследовательский институт биохимии СО РАМН.

E-mail: pwm64@ngs.ru

(геомагнитные бури), при действии на организм ионизирующей радиации. В высоких широтах это связано с активным проникновением в магнитосферу частиц «солнечного ветра» [3].

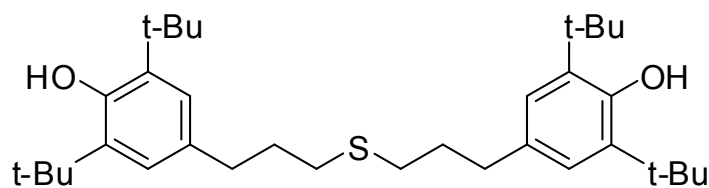
Естественной защитой биологических мембран от перекисного окисления липидов служит витамин Е (токоферол). Основным источником витамина Е и других антиоксидантов (витамины А, С) являются продукты питания. Нарушение режима питания, использование в пищу рафинированных продуктов создают дефицит природных антиоксидантов в организме, что способствует усилению перекисного окисления липидов биологических мембран и нарушению их функций [4]. Нежелательным последствием этих изменений в эритроцитарных мембранах является увеличение их микровязкости и нарушение их реологических свойств. Это затрудняет продвижение эритроцитов по капиллярам и приводит к диффузной гипоксии тканей. На крайнем Севере это явление известно как

«полярная одышка» [5]. Перед современной медициной стоит важная задача обеспечить человека, работающего в условиях Арктики, дополнительным количеством антиоксидантов. Такие препараты были получены на кафедре химии Новосибирского государственного педагогического университета [6].

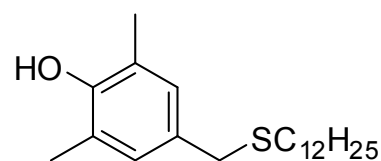
В данной работе была дана оценка эффективности антиоксидантных свойств производных витамина Е тиюфан-М и тиюфан с использованием в качестве модели биологических мембран плазматических мембран эритроцитов.

МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ

Материалы. В работе использовались производные витамина Е тиюфан-М додецил-[3-(3',5'-диметил-4-гидроксифенил)метил]сульфид и тиюфан бис-[3-(3',5'-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)пропил]сульфид производства ФГБОУ ВПО «НГПУ», НИИ химии антиоксидантов.



тиюфан



тиюфан-М

Флуоресцентный анализ теней эритроцитов. Эритроциты получали из свежесывленной крови после декапитации самцов крыс линии Вистар под легким нембуталовым наркозом. Кровь разбавляли впятеро изотоническим фосфатным буфером pH 7.35, содержащим 0.043 М KH_2PO_4 и 0.136 М Na_2HPO_4 . После осаждения клеток с помощью центрифугирования при 330 г в

течение 10 мин надосадочную жидкость сливали и процедуру повторяли еще 2 раза. Тени эритроцитов были получены после их гемолиза в гипотоническом фосфатном буфере (pH 7.35), содержащем 2.75 мМ KH_2PO_4 и 8.5 мМ Na_2HPO_4 . Тени осаждались центрифугированием при 5500 г, надосадочная жидкость сливалась. Процедура

повторялась четыре раза. Получение и хранение теней производилось при 4°C.

Измерения флуоресценции проводились на спектрофлуориметре «Шимадзу» RF-5301(PC)SCE. В кварцевую кювету размером 1x1x4 см³ наливали 4 мл гипотонического фосфатного буфера содержащего 2,75 mM KН₂РO₄ и 8,5 mM Na₂НРO₄, рН=7,35 и тени эритроцитов. Концентрация белков теней определялась методом Варбурга и Кристиана по изменению оптической плотности взвеси [7]. В среднем она колебалась в пределах 0,200-0,350 мг/мл.

Кювета с взвесью теней помещалась в термостат спектрофлуориметра на 10 минут. Выход температуры в кювете на стационарный режим контролировался электронным термометром. Во всех экспериментах температура в кювете была 36°C. После выхода температуры в кювете на стационарный режим проводились контрольные измерения интенсивности собственной флуоресценции остатков триптофана в белках мембран. Снимался спектр излучения триптофана в диапазоне 300нм ≤ λ ≤ 400нм при длине волны возбуждения λ = 281нм, при этом максимум интенсивности излучения приходился на λ = 332нм. Спектральная ширина щелей 1,5/10.

Измерение микровязкости мембран эритроцитов. Измерения микровязкости мембран эритроцитов проводились на спектрофлуориметре «Шимадзу» RF-5301(PC)SCE. Опытный образец готовился следующим образом. В кварцевую кювету размером 1x1x4 см³ наливалось 4 мл гипотонического фосфатного буфера (рН 7.35), содержащем 2.75 mM KН₂РO₄ и 8.5 mM Na₂НРO₄, тени эритроцитов, необходимое количество производных витамина Е, флуоресцентный зонд пирен. Все компоненты до этого хранились при 4°C.

Концентрация белка теней в кювете составляла 0.200–0.350 мг/мл, пирена – 7.76x10⁻⁶ М. Пирен разводился в этаноле, его исходная концентрация составляла – 1.5x10⁻³ М. Кювету помещали в термостат спектрофлуориметра на 10 минут, после этого проводили измерения флуоресценции при температуре 36°C. Перед тем как поставить пробу в термостат спектрофлуориметра ее энергично встряхивали в течение 1 минуты. Для измерения флуоресценции теней при нагружении их другим количеством производных витамина Е каждый раз точно также готовилась новая проба. Такая процедура связана с тем, что пирен способствует быстрой деградации мембран эритроцитов.

Для измерения микровязкости липидного бислоя вблизи мембранных белков (область белок-липидного взаимодействия) использовалась длина волны возбуждения λ = 281 нм и спектральная ширина щелей 1.5/5. Микровязкость липидного бислоя вдали от мембранных белков (область липид-липидного взаимодействия) использовалась длина волны возбуждения λ = 337 нм и спектральная ширина щелей 1.5/3. Максимумы излучения наблюдались при λ = 374 нм и λ = 393 нм (вибранные пики излучения мономеров пирена), и λ = 468 нм (максимум излучения димеров пирена).

Относительная микровязкость мембран описывалась отношением $L = \frac{\eta(A)}{\eta(0)}$, где $\eta(A)$ и $\eta(0)$ микровязкости мембран при добавлении во взвесь тиофана концентрации А и без добавления тиофана, соответственно. Для области липид-липидного взаимодействия относительная микровязкость L вычислялась по формуле

$$L = \frac{\eta(A)}{\eta(0)} = \frac{F_{468}(0)}{F_{468}(A)} \cdot \frac{F_{393}(A)}{F_{393}(0)}$$

где $F_{468}(A)$ интенсивность флуоресценции пирена при $\lambda = 468$ нм при концентрации A гормона во взвеси; $F_{468}(0)$ интенсивность флуоресценции пирена при $\lambda = 468$ нм при отсутствии гормона во взвеси. $F_{393}(A)$ and $F_{393}(0)$ интенсивность флуоресценции пирена при $\lambda = 393$ нм при концентрации A гормона во взвеси и при отсутствии гормона во взвеси, соответственно.

Для области белок-липидного взаимодействия относительная микровязкость L вычислялась по формуле

$$L = \frac{\eta(A)}{\eta(0)} = \frac{F_{468}(0) - I_{468}}{F_{468}(A) - I_{468}} \cdot \frac{F_{393}(A) - I_{393}}{F_{393}(0) - I_{393}}$$

где I_{393} и I_{468} интенсивность флуоресценции триптофановых остатков в мембранных белках при $\lambda = 393$ нм и $\lambda = 468$ нм, соответственно. Относительная погрешность измерения относительной микровязкости равна 6 %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Была получена зависимость относительной микровязкости мембран эритроцитов L от удельной концентрации тиюфана-М во взвеси (рис. 1). В работе рассчитывалась удельная концентрация тиюфана-М и тиюфана: молярная концентрация этих молекул поделена на концентрацию белков теней во взвеси. Относительная микровязкость мембран в области липид-липидного взаимодействия при увеличении концентрации тиюфана-М вначале увеличивалась. После увеличения на 20 % она вышла на плато. В области белок-

липидного взаимодействия напротив, микровязкость уменьшалась на 12 % и выходила на плато. Интенсивность собственной флуоресценции остатков триптофана в белках мембран при добавлении тиюфана-М увеличивалась (рис. 2), при 10^{-9} моль/мг белка выходила на плато. При добавлении тиюфана микровязкость уменьшалась как в области липид-липидных взаимодействий, так и в области белок-липидных взаимодействий мембран (рис. 3). Микровязкость достигала минимума при $0.7 \cdot 10^{-9}$ моль/мг белка, при дальнейшем увеличении концентрации тиюфана микровязкость увеличивалась. Максимальное уменьшение микровязкости составляло 20 % для области липид-липидного взаимодействия и 15 % для области белок-липидного взаимодействия. Интенсивность собственной флуоресценции остатков триптофана в белках мембран при добавлении тиюфана также незначительно увеличивалась (рис. 4).

Можно предположить следующий механизм взаимодействия тиюфана и тиюфана-М с мембраной. Тиюфан и тиюфан-М, подобно холестерину, погружались в фосфолипидный бислой, закоривались своими фенольными кольцами с гидрофильными ОН-группами на внешней поверхности мембран, где много гидрофильных групп фосфолипидов и белков мембраны. В гидрофобную область мембран проникали жирнокислотные хвосты, содержащие сульфидную группу. Можно предположить, что эти хвосты так перераспределяли диполи воды, содержавшиеся в биомембране, что микровязкость мембран уменьшалась. С другой стороны, подобно холестерину, тиюфан и тиюфан-М, по-видимому, могли увеличивать жесткость мембраны за счет

образования новых связей между своими активными группами и полярными группами фосфолипидов и белков мембраны. В случае тиофана-М механизм увеличения жесткости мембраны преобладал над его уменьшением, микровязкость в липид-липидной области увеличивалась. Диполи воды вытеснялись в область белок-липидных взаимодействий, где микровязкость уменьшалась, а интенсивность собственной флуоресценции остатков триптофана в белках мембран увеличивалось (рис. 3). Проникновение тиофана способствовало уменьшению микровязкости мембраны, но параллельно работал механизм увеличения микровязкости, что приводило к куполообразной форме зависимости микровязкости от концентрации тиофана.

Разницу во влиянии на микровязкость мембран тиофана и тиофана-М можно объяснить тем, что в тиофане атом серы находится дальше от бензольного кольца. Он проникал глубже в гидрофобную часть мембраны, мог более равномерно перераспределять диполи воды между жирнокислотными хвостами фосфолипидов. Молекулы воды, встраиваясь между жирнокислотными хвостами фосфолипидов, увеличивали расстояние между молекулами фосфолипидов и ослабляли взаимодействие между ними. Это приводило к уменьшению жесткости мембраны.

Исследовалось защитное действие тиофана от перекисного окисления липидов (ПОЛ) (рис. 5 и 6). Для моделирования ПОЛ во взвесь тений добавляли 3мМ перекиси водорода H_2O_2 . В результате ПОЛ происходит образование радикалов в области связей $C=C$ в жирнокислотных хвостах фосфолипидов. Это приводило к образованию сшивок между молекулами, усилению жесткости биомембран. При добавлении 3мМ перекиси водорода к взвеси

эритроцитов происходило увеличение относительной микровязкости мембран в области липид-липидного взаимодействия на 25 % (на рис. 5 горизонтальная линия). В области белок-липидного взаимодействия микровязкость снижалась на 8 % (рис. 5). При добавлении тиофана происходило уменьшение микровязкости мембран. При его удельной концентрации $0.3 \cdot 10^{-9}$ моль/мг белка микровязкость мембран восстанавливалась до контрольного значения 1. При концентрации тиофана $0.6 \cdot 10^{-9}$ моль/мг белка она достигала минимального значения, после этого начинала возрастать. Максимальное уменьшение микровязкости составляло примерно 20 % и в области липид-липидного взаимодействия и в области белок-липидного взаимодействия.

Тиофан является высокоэффективным ингибитором процессов свободно-радикального окисления, что обусловлено синергетическим сочетанием антирадикальной активности его фенольных групп с противопероксидной активностью бивалентной серы [6]. Тиофан уменьшает количество сшивок между молекулами фосфолипидов, тем самым уменьшая микровязкость биомембраны. Это позволяет эритроцитам более легко проходить по капиллярам, уменьшается артериальное давление, уменьшается возможность развития ишемической болезни сердца.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспериментально установлено, что тиофан и тиофан-М при добавлении во взвесь эритроцитов взаимодействуют с мембранами и уменьшают их микровязкость. Тиофан активно защищает мембрану эритроцитов от перекисного окисления липидов, уменьшает микровязкость мембран и восстанавливает реологические свойства эритроцитов.

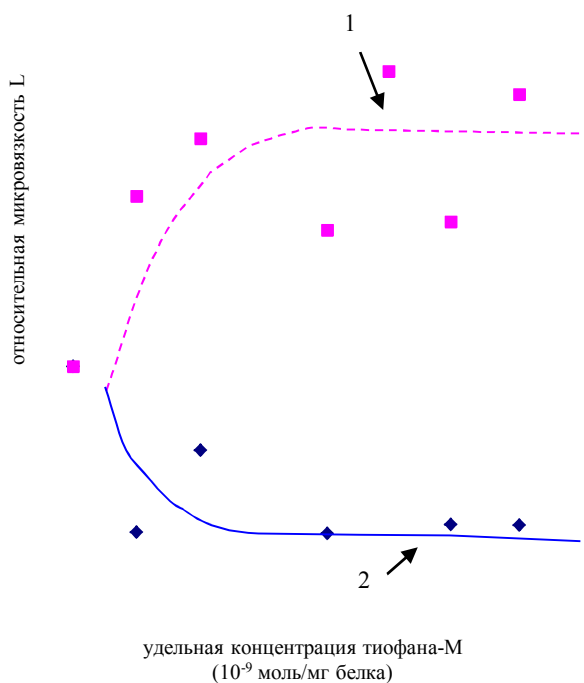


Рисунок 1.

Зависимость относительной микровязкости мембран эритроцитов L от удельной концентрации тиюфана-М во взвеси.

Кривая 1 – область липид-липидного взаимодействия, кривая 2 – область белок – липидного взаимодействия.

Рисунок 2.

Зависимость тушения флуоресценции триптофана от удельной концентрации тиюфана-М во взвеси.

F – интенсивность флуоресценции триптофановых групп мембранных белков при добавлении тиюфана-М, $F(0)$ – интенсивность флуоресценции триптофановых групп мембранных белков при нулевой концентрации тиюфана-М.

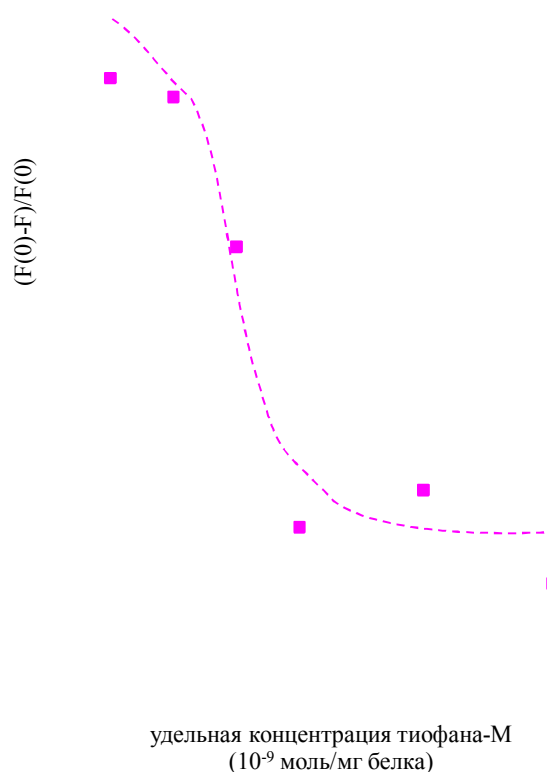


Рисунок 3.

Зависимость относительной микровязкости мембран эритроцитов L от удельной концентрации тиюфана во взвеси. Кривая 1 – область липид-липидного взаимодействия, кривая 2 – область белок – липидного взаимодействия.

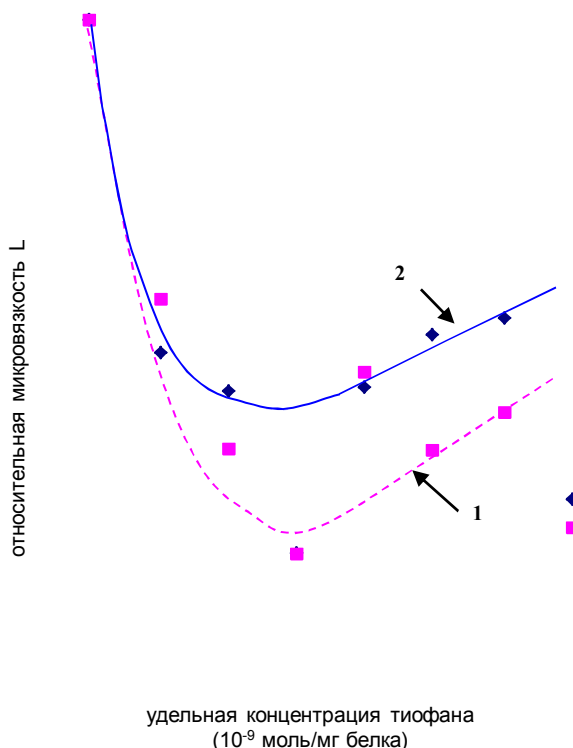
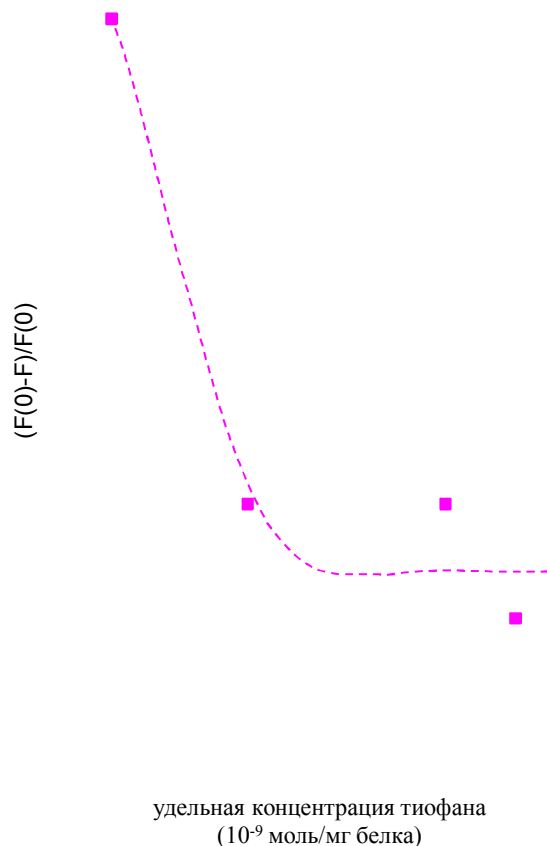


Рисунок 4.

Зависимость тушения флуоресценции триптофана от удельной концентрации тиюфана во взвеси.

F – интенсивность флуоресценции триптофановых групп мембранных белков при добавлении тиюфана-М, $F(0)$ – интенсивность флуоресценции триптофановых групп мембранных белков при нулевой концентрации тиюфана.



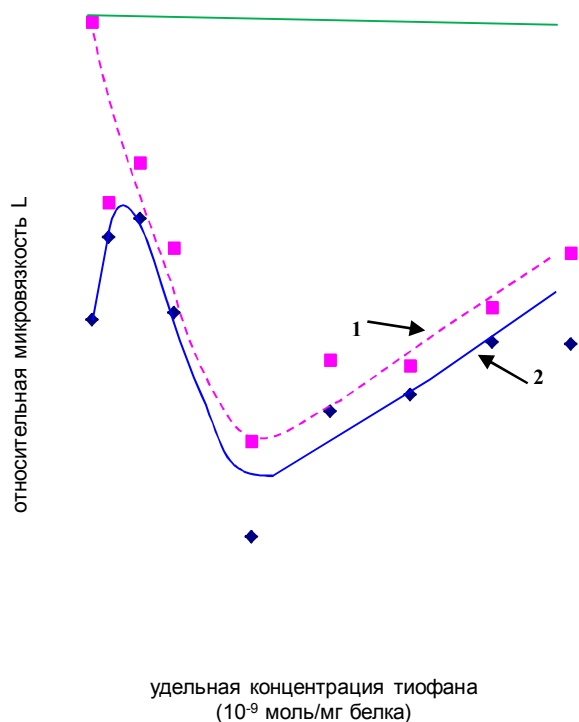


Рисунок 5.

Зависимость относительной микровязкости мембран эритроцитов L от удельной концентрации тиюфана во взвеси при добавлении во взвесь 3 мМ перекиси водорода.

За единицу принята микровязкость мембран без добавления перекиси водорода и тиюфана.

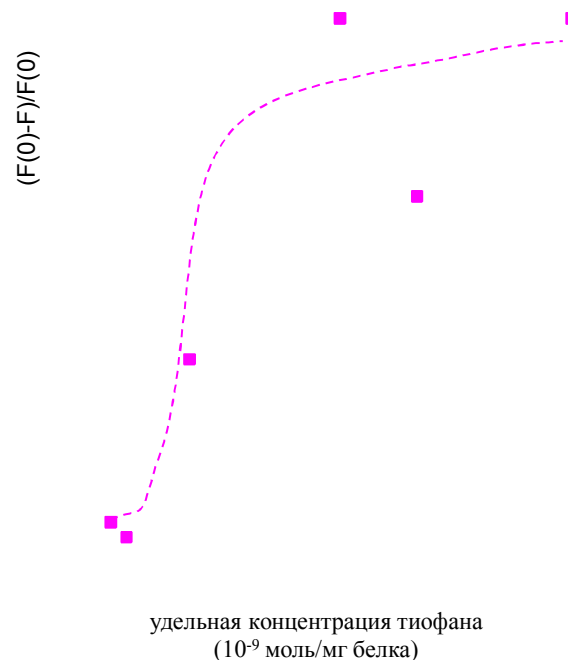
Кривая 1 – область липид-липидного взаимодействия, кривая 2 – область белок – липидного взаимодействия.

Горизонтальная прямая – значение относительной микровязкости в области липид-липидного взаимодействия при добавлении 3 мМ перекиси водорода без добавления тиюфана.

Рисунок 6.

Зависимость тушения флуоресценции триптофана от удельной концентрации тиюфана во взвеси при добавлении во взвесь 3 мМ перекиси водорода.

F – интенсивность флуоресценции триптофановых групп мембранных белков при добавлении тиюфана, $F(0)$ – интенсивность флуоресценции триптофановых групп мембранных белков при нулевой концентрации тиюфана.



СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Панин Л. Е.** Детерминированные системы в физике, химии, биологии. – Новосибирск : Сиб. унив. изд-во, 2006. – 202 с.
2. **Панин Л. Е., Мокрушников П. В., Куницын В. Г., Панин В. Е., Зайцев Б. Н.** Основы многоуровневой мезомеханики наноструктурных переходов в мембранах эритроцитов и их разрушения при взаимодействии с гормонами стресса// Физическая мезомеханика. – 2011. – т. 14. – № 1. – С. 5–17.
3. **Казначеев В. П., Куликов В. Ю., Панин Л. Е.** Особенности экологических факторов высоких широт/ Механизмы адаптации человека в условиях высоких широт / Отв. ред. Казначеев В. П. – Л.: Медицина, 1980. – С. 10–24.
4. **Панин Л. Е.** Человек в экстремальных условиях Арктики // Бюлл. СО РАМН. – 2010. – т. 30. – №3. – С. 92–97.
5. **Авцын А. П., Марачёв А. Г.** Проявления адаптации и дезадаптации у жителей Крайнего Севера // Физиология человека. – 1975. – т.4. – С. 3–14.
6. **Овчинникова Л. П., Роцкая У. Н., Васюнина Е. А., Сеницина О. И., Кандалинцева Н. В., Просенко Н. В., Невинский Г. А.** Антиокислительная активность тиофана [бис-[3-(3',5'-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)пропил]сульфида] // Биорг. Химия. – 2009. – Т. 35. – № 3. – С. 417–423.

© L. E. Panin, P. V. Mokrushnikov

UDC 538.9 + 577.352.332/.335 + 577.175.5 + 577.31

EFFECTS OF SYNTHETIC VITAMIN E DERIVATIVE ON THE RHEOLOGICAL PROPERTIES OF RED BLOOD CELL MEMBRANES

L. E. Panin, P.V. Mokrushnikov (Novosibirsk, Russia)

Methods of the fluorescent analysis was investigated action of derivatives of vitamin E tiofan and tiofan-M on rheological properties of membranes of erythrocytes. The first formulation reduced the microviscosity of a lipid-lipid, and protein-lipid interactions. The second drug reduced microviscosity of the protein-lipid interactions, and increased in the area of a lipid-lipid interactions. Checking the effectiveness of antioxidant erythrocyte membranes showed that thiophane significantly inhibits peroxidation of membrane lipids and the formation of lipid-protein cross-links, restoring the rheological properties of red blood cells. This drug is recommended by us to prevent lipid peroxidation in persons working in Arctic conditions.

Keywords: microviscosity of membranes, lipoperoxidation, tiofan

REFERENCES

1. **Panin L. E.** Deterministic systems in physics, chemistry, and biology. – Novosibirsk: Sib. Univ. Publishers, 2006. – 202 p.
2. **Panin L. E., Mokrushnikov P. V., Kunitsyn, V. G., Panin V. E., Zaitsev B. N.** Fundamentals of multilevel mesomechanics nanostructured transition in membranaz destruction of red blood cells and their interaction with stress hormones // Physical Mesomechanics. – 2011. – T. 14. – № 1. – Pp. 5–17.
3. **Kaznacheev V. P., Kulikov V. Yu., Panin L. E.** Features of ecological factors of high latitude / mechanisms of human adaptation to high latitudes / Red. Kaznacheev V. P. – Leningrad : Medicine, 1980. – Pp. 10–24.
4. **Panin L. E.** Man in the extreme conditions of the Arctic // Bull. RAMS. – 2010. – V. 30. – № 3. – Pp. 92–97.
5. **Avtsyn A. P. Marachev A. G.** Manifestations of adaptation and maladjustment among residents of the Far North // Human Physiology – 1975. – V. 4. – Pp. 3–14.
6. **Ovchinnikov L. P., Rotskaya U. N., Vasyunina E. A., Sinitsyna O. I., Kandalintseva N. V., Prosenko A. E., Nevinsky G. A.** Antioxidant activity of the Thiophane // Bioorg. Chemistry. – 2009. – Vol. 35. – N 3. – Pp.417–423.

Panin Lev Evgenjevich – Doctor of Medical Sciences, Academician of the Russian Academy of Medical Sciences, Director, State Research Institute of Biochemistry SB RAMS.

E-mail: panin@soramn.ru

Mokrushnikov Pavel Valentinovich – research associate, State Research Institute of Biochemistry SB RAMS.

E-mail: pwm64@ngs.ru

© Т. Р. Петросян, О. В. Геворгян

УДК 616.8-092

ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО МЕЛАНИНА НА ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ ПРОВОДИМОСТИ В МОТОРНОМ ТРАКТЕ У КРЫС*

Т. Р. Петросян, О. В. Геворгян (Ереван, Армения)

Односторонняя перерезка пирамидного тракта на бульбарном уровне, выполненная после предварительной выработки инструментального условного рефлекса (ИУР) и без его выработки вызывала гемипарез конечностей у крыс. Через сутки после этой операции половине оперированных животных как с выработанным ИУР, так и без его выработки, внутримышечно вводили раствор бактериального меланина в концентрации 6 мг/мл. Сравнение сроков восстановления ИУР и балансирующего движения парализованной задней конечности у оперированных крыс без введения меланина и с его инъекцией показало, что у меланиновых животных время посттравматической реабилитации намного короче, а восстановление движения происходило быстрее и полнее. Показано, что разница в сроках восстановления двигательных функций у крыс в этом случае обусловлена протекторным действием бактериального меланина.

Ключевые слова: инструментальный условный рефлекс, крысы, кортикоспинальная система, бактериальный меланин.

Введение

Исследование восстановления двигательных функций после травмы структур ЦНС является весьма актуальным в связи с ростом причин, их вызывающих. Процесс полной и скорейшей реабилитации является задачей первостепенной важности, так как для восстановления поврежденных структур головного и спинного мозга у

взрослых млекопитающих эта возможность весьма ограничена. Известно, что для этого требуется компенсаторный рост сохранившихся после повреждения нервных волокон, или истинный регенеративный рост поврежденных аксонов [1]. А эти процессы очень медленно протекают в нервной системе из-за наличия в ней открытых в последние годы ростормозящих протеинов в миелине

* Статья подготовлена по результатам работы Международной научно-практической конференции «Свободные радикалы и антиоксиданты в химии, биологии и медицине» (1-4 октября 2013 г.) в рамках реализации Программы стратегического развития ФГБОУ ВПО «Новосибирский государственный педагогический университет» на 2012–2016 гг.

Петросян Тигран Размирович – кандидат биологических наук, доцент кафедры кинезиологии. Армянский государственный институт физической культуры.

E-mail: tigpetrosyan@mail.ru

Геворгян Ольга Вагаршаковна – научный сотрудник лаборатории физиологии ЦНС Института физиологии, Национальная академия наук Республики Армения.

волокон ЦНС и на поверхности олигодендроцитов, что являются сильными факторами, ограничивающими рост поврежденных аксонов и восстановление связей спинного и головного мозга. В литературе показано, что кортикоспинальные и рубро-спинальные нейроны сохраняются после их аксотомии достаточно долгое время [2] и с помощью нейротрофных факторов возможно приостановить или ликвидировать атрофию в кортикоспинальных или рубро-спинальных нейронах, аксотомированных год назад [3]. К таким факторам относятся и типичные ростосвязанные протеины, которые усиливают регенеративную способность нейронов в ЦНС взрослых млекопитающих [4]. Однако травма и посттравматические преобразования в структурах ЦНС являются динамичными процессами, которые требуют многостороннего вмешательства. Подтверждением могут служить результаты многочисленных поведенческих исследований. В большом количестве нейрофизиологических исследований [5–9] показано восстановление локомоции и движения конечностей у крыс и мышей после повреждения аксонов, в котором большую роль играла также каждодневная длительная тренировка, которая активизирует специфические мишени новых связей после травмы [10], чем можно объяснить более раннее восстановление движений у крыс с заранее выработанными инструментальными условными рефлексам по сравнению с интактно оперированными животными.

Для успешного и быстрого восстановления двигательных функций травмированных структур ЦНС важен комплексный подход. С этой целью, в первую очередь, необходимо предотвратить вторичное перерождение аксотомированных нейронов и такой результат был получен в

наших исследованиях с помощью бактериального меланина. В данной работе исследовалось влияние поперечной односторонней перерезки бульбарной пирамиды у крыс на ход выработки ИУР у интактных животных, на восстановление предварительно выработанного ИУР, а также воздействие на этот процесс последующего постоперационного внутримышечного введения водорастворимого бактериального меланина, синтезируемого мутантом *Bacillus Thuringiensis*, полученного сотрудниками Института Биотехнологии.

Материал и методика

Исследование было проведено на 24 белых нелинейных крысах – самцах в возрасте 2,5–3 месяца, с массой тела 180–220 гр. Крысы были разделены на 4 группы. 12 крыс предварительно обучались инструментальному (оперантному) рефлексу балансирования на вращающемся (9 об/мин) горизонтальном бруске с диаметром 2 см и длиной 30 см, закрепленном на высоте 90 см над мягкой подушкой [11]. Испытание повторяли в день 10 раз, критерием выполняемости рефлекса было балансирование животного на вращающемся бруске не менее 250с, а интервал для отдыха составлял 60с.

Животных оперировали под нембуталовым наркозом (40мг/кг, внутривенно). Унилатеральную поперечную перерезку кортикоспинального тракта производили на бульбарном уровне чуть выше от его перекреста. На следующий день после операции одной группе (n=6) с предварительно выработанным условным рефлексом внутримышечно вводили водорастворимый бактериальный меланин в концентрации 6 мг/мл, из расчета 170 мг/кг. Другая группа служила контролем.

Остальных 12 интактных крыс после пирамидотомии тоже разделили на две равные группы. Одна из них служила контролем для второй группы, которой через сутки после операции так же вводили бактериальный меланин и на следующий день приступали к выработке рефлекса у всех 12-и крыс.

Пирамидотомию производили унилатерально при вентральном подходе. После разреза на средней линии в области вентрального отдела шеи отсепаровывали щитовидные железы и оттягивали в сторону. Осторожно смещали в сторону также трахею и пищевод, обнажая базо-затылочный отдел и кость, покрывающую пирамиды, скусывая ее ростральнее от большого затылочного отверстия. После этого открывались пирамиды с вентральной стороны продолговатого мозга [12]. Специальным острым ножом перерезали пирамиду с большой осторожностью, чтобы не повреждать базилярную мозговую артерию, расположенную между пирамидами. Выработку инструментального рефлекса начинали на следующий день после операции, или на следующий день после введения бактериального меланина. Неврологический статус этих животных восстанавливался в основном в первые дни, но флексорный тонус задней конечности испытываемой стороны восстанавливается значительно позже, особенно если у крыс заранее, до пирамидотомии, не вырабатывали условный рефлекс.

Для оценки уровня достоверности различий сроков восстановления ИУР и балансирующего движения задней парализованной конечности в постоперационном периоде, использовался t-критерий Стьюдента [13].

Результаты и обсуждение

Эксперименты на 24 крысах были проведены в следующих четырех сериях: серия 1 – у крыс с заранее выработанным инструментальным условным рефлексом производили унилатеральную поперечную пирамидотомию на бульбарном уровне. После операции у этих животных возобновляли выработку рефлексов до полного восстановления условного рефлекса и балансирующего движения задней конечности оперированной стороны. Эксперименты этой серии служили контролем для серии 2, в которой у животных производились те же процедуры, что и у крыс серии 1, только после операции, через 24 часа, им вводили внутримышечно бактериальный меланин, а на следующий день после этого возобновляли выработку условного рефлекса.

Серии 3 и 4. Предварительно у всех интактных крыс этих серий производили пирамидотомию, после чего животным серии 3 через сутки вводили бактериальный меланин и на следующий день приступали к выработке инструментального условного рефлекса. У крыс серии 4 на следующий день после пирамидотомии начинали выработку рефлекса и эта серия служила контролем для серии 3. На рисунке 1 приведена микрофотография места среза бульбарной пирамиды в каудальном отделе продолговатого мозга. Статистическая обработка полученных результатов показала, что у крыс серии 1 прочные инструментальные рефлексы вырабатывались в среднем за $2,5 \pm 1,1$ дня (рис. 2А, правая часть графика). В первое время после возобновления выработки ИУР после операции у крыс с восстановлением балансирующего движения задней конечности наблюдаемые маленькие

колебания вследствие скольжения лапы в пределах 10 секунд принято считать нормой. Восстановление движения парализованной

конечности (флексорный тонус) происходило за 14–17 дней после возобновления постоперационной выработки ИУР.

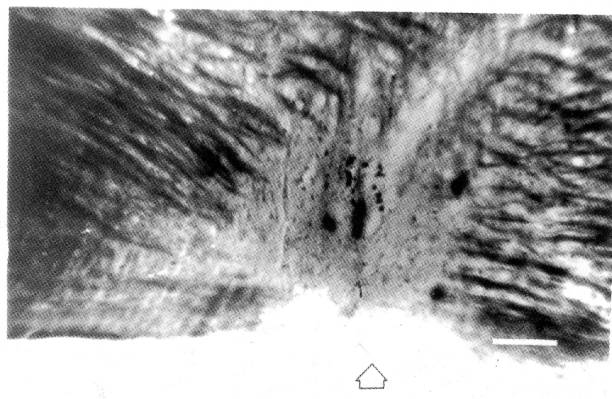


Рисунок 1.

Микрофотография сагитального среза места перерезки пирамиды на каудальном уровне продолговатого мозга. На рисунке виден ход миелинизированных волокон. Сторона перерезки показана светлой стрелкой.

Масштаб 175μm.

У крыс серии 2, получивших инъекцию бактериального меланина через 24 часа после операции, в норме ИУР вырабатывался в среднем за $2,5 \pm 0,83$ дня, а после возобновления выработки после операции и введения бактериального меланина – в среднем за $1,75 \pm 0,95$ дня (рис. 2 А и Б). Восстановление движения конечности у меланиновых крыс

происходило через 2 дня после возобновления выработки рефлекса. Сравнение сроков восстановления ИУР и флексорного тонуса мышц задней балансирующей конечности у животных этих двух серий показало, что у меланиновых крыс оба показателя составляют 2–4 дня, что в несколько раз меньше, чем у контрольных крыс.

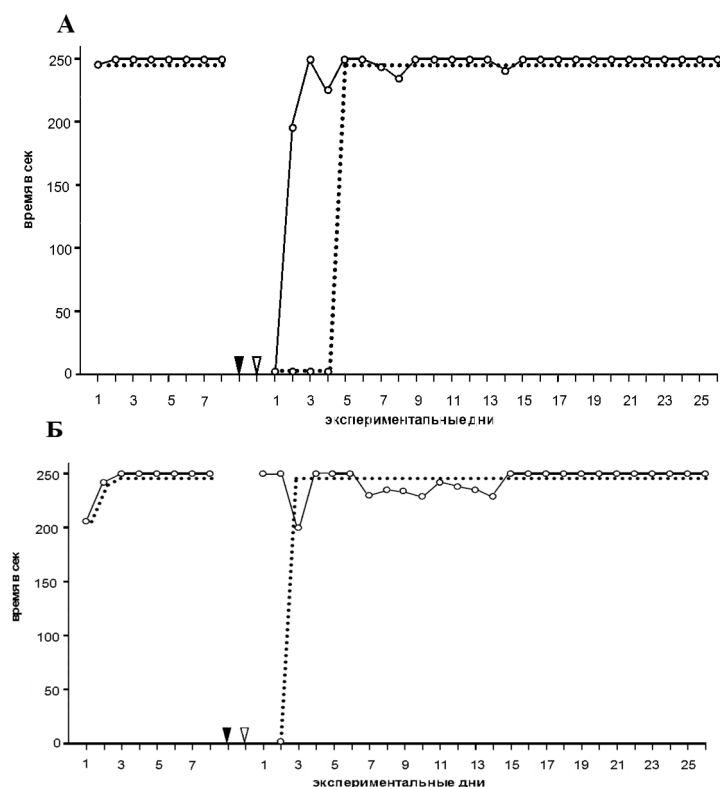


Рисунок 2.

Восстановление инструментального условного рефлекса (сплошная линия) у крыс после унилатеральной пирамидотомии (темный треугольник на оси абсцисс) и предварительной выработки ИУР (левая часть графика), а в правой части графика возобновление выработки рефлекса после введения бактериального меланина в концентрации 6 мг/мл (светлый треугольник на оси абсцисс).

А – крыса № 1, серия 2;

Б – крыса № 4, серия 2;

В – крыса №1, серия 1 (контроль).

По оси абсцисс – дни экспериментов; по оси ординат – среднее время нахождения животного на вращающемся бруске.

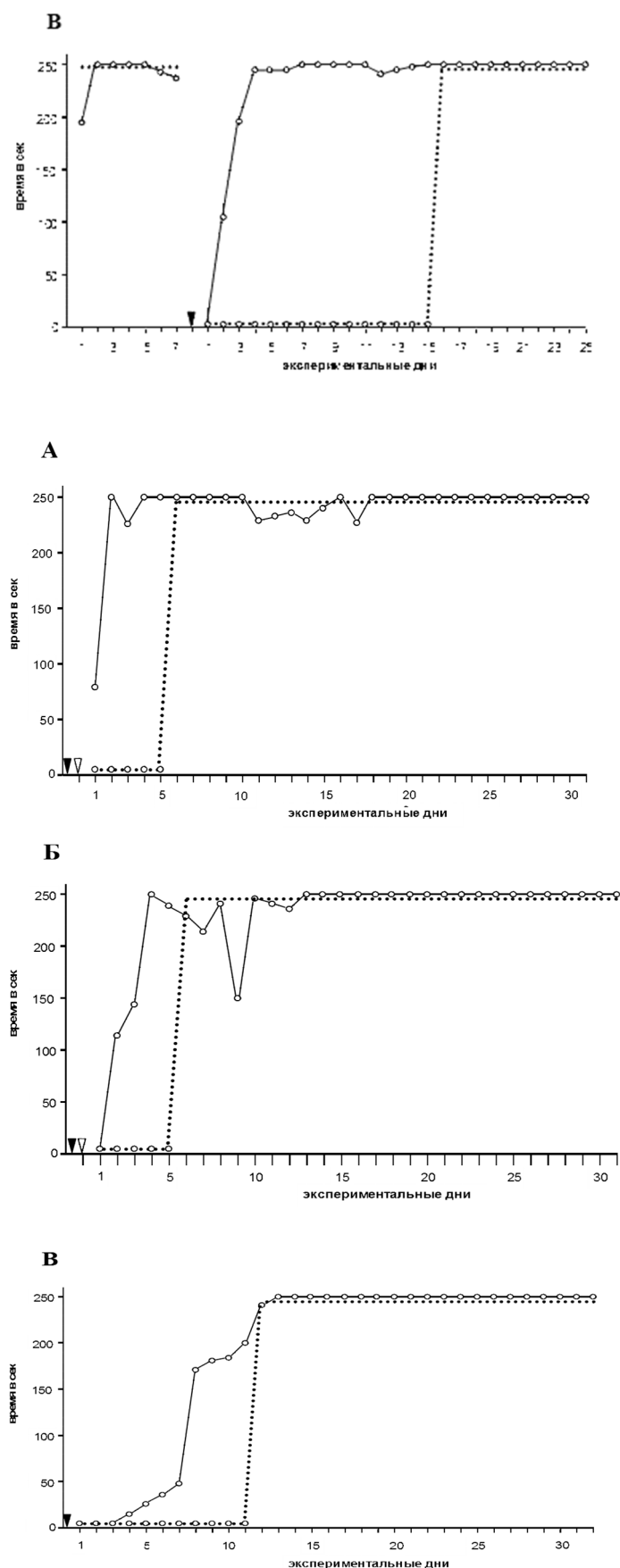


Рисунок 3.

Выработка инструментального рефлекса (сплошная линия) и восстановление движения парализованной конечности (пунктирная линия) у интактных крыс после предварительной пирамидотомии (темный треугольник на оси абсцисс) и введения раствора бактериального меланина в концентрации 6 мг/мл (светлый треугольник на оси абсцисс).

А – крыса № 1, серия 3;

Б – крыса № 2, серия 3;

В – крыса № 1, серия 4 (контроль).

Более интересную картину наблюдали у интактно оперированных крыс. Животным серии 4 не вводили бактериальный меланин, а через день после операции начал вырабатываться условный рефлекс и только в среднем за $16,5 \pm 3,6$ дней был выработан ИУР, тогда как у меланиновых крыс серии 3 рефлекс вырабатывался в среднем за $2,7 \pm 1,15$ дн. (рис. 3). Восстановление балансирующего движения у меланиновых крыс (серия 3) произошло в среднем за $5,7 \pm 0,58$ дней, тогда как у безмеланиновых крыс – за 19 дней. Как видим, срок выработки рефлекса и срок восстановления движения балансирующей конечности укорачивается в несколько раз после введения бактериального меланина (7 и 3 раза соответственно).

Результатами экспериментов предыдущих лет показано, что по своим свойствам использованный нами бактериальный меланин в организме животных проявляет сходные с нейромеланином протекторные свойства. Прежде всего он улучшает трофику нервной ткани за счет усиления васкуляризации, угнетает образование глиального рубца, повышает регенеративную способность нейронов после аксотомии, предотвращая у них вторичное перерождение [14–15].

В литературе по нейромеланину, опубликованной в последние годы указывается, что он аккумулируется в допаминергических нейронах компактной части черной субстанции (SNC) и голубого пятна (nLC) и его истощение приводит к нейродегенерации и возникновению болезни Паркинсона (БП). Показано, что у многих видов млекопитающих, в том числе и у крыс, нейромеланин накапливается в допаминергических нейронах больше всего в указанных структурах мозга. Однако окончательно не выяснен вопрос

взаимосвязи между наличием нейромеланина и уязвимостью нейронов в нормальных физиологических условиях или в патогенезе развития нейродегенеративных болезней, но считается, что нейромеланин играет протекторную роль в мозге человека путем блокирования свободных металлов и токсических молекул [16–17]. В доступной нам физиологической литературе мы не встречали экспериментальных нейрофизиологических исследований, посвященных изучению свойств нейромеланина или бактериального меланина, поэтому вынуждены чаще обращаться к опубликованным работам нашей лаборатории.

Известно, что после травмы в ЦНС первой реакцией нервной системы у взрослых животных следствием быстрой пролиферации астроцитов является реактивный глиоз или образование глиального рубца, который тормозит рост аксона и его ремиелинизацию [18]. Но если в начальном периоде гибели или повреждения клеток использовать нейропротекторные средства, можно терапевтическим вмешательством восстановить травмированный участок ЦНС, предотвращая образование плотного глиального рубца и дегенерацию аксотомированных нейронов [19]. В экспериментах, выполненных на крысах, после удаления сенсомоторной коры на площади 15 мм^2 лунка, образовавшаяся в коре, по окончании эксперимента у получивших бактериальный меланин в концентрации 6 мг/мл крыс почти полностью была заполнена клеточными элементами нервной ткани коры и отсутствовал жесткий соединительнотканый рубец, обычно покрывающий поверхность такой же лунки у не получивших меланин контрольных крыс.

После электролитического разрушения латерального ядра мозжечка и введения через 24 часа бактериального меланина, той же концентрации морфогистохимическим методом показано, что после разрушения ядра полностью заполнен клетками трек электрода, а на участке повреждения сохранены нейроны. На стенках сосудов четко видны перициты, которые являются участвующими в ангиогенезе клетками, образованными в результате деления стволовых клеток, что предположительно имело место в данном случае [20]. Возможно, это является результатом благоприятного для деления стволовой клетки изменением трофики у меланиновых крыс [15].

Перерезка пирамидного тракта, который «является более специализированной формой структурной и функциональной организации мозга млекопитающих» [21], влечет за собой определенные двигательные нарушения и наиболее вероятной структурой, которая могла бы принять участие в ликвидации пирамидного дефицита, является кортико-рубро-спинальная система, которая берет начало в тех же областях коры мозга и выполняет сходные с кортикоспинальным трактом функции. Этот вопрос неоднократно обсуждался в публикациях нашей лаборатории [5–8, 14–15]. Эти две системы взаимозаменяют друг друга после травмы одной из них и переключение нисходящих влияний охватывает корковые, подкорковые, стволовые структуры с вовлечением нижней оливы и мозжечка. В экспериментах с применением бактериального меланина значительное ускорение процесса восстановления инструментального рефлекса и движения парализованной конечности происходит благодаря облегчению переключения двигательной функции с кортикоспинального на кортико-рубро-

спинальный тракт [14]. Внутримышечное введение бактериального меланина ускоряет восстановление ИУР и сгибательного движения конечности не только у крыс с заранее выработанными условными рефлексами (тренированные), но и у интактно оперированных животных. Во всех случаях, когда в структурах ЦНС, участвующих в нисходящем контроле движений вызывали травму (удаление сенсомоторной коры, разрушение латерального ядра мозжечка, перерезка пирамидного тракта), инструментальный рефлекс (поза) восстанавливался раньше, чем сгибательное движение задней балансирующей конечности, парализованной вследствие операции. Можно предположить, что после перерезки бульбарной пирамиды (или удаления сенсомоторной коры) вследствие повреждения пирамидных аксонов разрушаются контакты особенно быстропроводящих пирамидных волокон с мотонейронами мышц-сгибателей. Но после введения бактериального меланина восстановление флексорного тонуса дистальных мышц задней конечности крыс, участвующих в организации балансирующего движения после пирамидотомии, бывает быстрым и полным, наступая даже раньше (2–6 дней), чем у животных после удаления сенсомоторной коры (10–12 дней) и после введения раствора бактериального меланина в концентрации 6 мг/мл. В данном случае может иметь значение и маленький размер (не более 1 мм³) травмы по сравнению с удалением обширной (30 мм³) области сенсомоторной коры [14]. Интересно, что у интактно пирамидотомированных крыс ИУР вырабатывался много позже, чем у получивших меланин крыс, а балансирующее движение – в 4 раза медленнее по сравнению с их контролем (рис. 3 Б и В). Это является

проявлением протекторного влияния бактериального меланина и тренированности животных благодаря каждодневному десятикратному повторению ИУР.

Таким образом, укорочение сроков компенсаторного восстановления ИУР у животных, получивших бактериальный меланин, свидетельствует о его протекторном действии. Кроме того, в экстраклеточных электрофизиологических экспериментах, выполненных на крысах [22] при раздражении хвостатого ядра была записана активность нейронов черной субстанции до и после внутрибрюшинного введения бактериального меланина, а также при комбинированном использовании ГАМК, ГАМК-амида, глутамина и этаноламин-О-сульфата. Выяснилось, что меланин оказывает четкое долгодлящее возбуждающее влияние при всех комбинациях с вышеуказанными веществами

и предварительное его введение упраздняло тормозящее влияние этих веществ.

Сравнение результатов экспериментов с пирамидотомией у животных контрольных групп с заранее выработанным ИУР и без его выработки убедительно показывает, что внутримышечное введение раствора бактериального меланина низкой концентрации благотворно влияет на восстановление движений, ускоряя посттравматическую реабилитацию после перенесенной травмы ЦНС у взрослых животных, возможно усилением процесса спраунтинга и формированием новых связей [3, 22] или быстрой активацией процесса деления стволовых клеток, так как бактериальный меланин проявляет те качества, которые необходимы для структурного и функционального восстановления ЦНС после травмы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Chen R., Cohen L.G. Hallet M.** Nervous system reorganization following injury // *Neuroscience*, 2002. – Vol. 111. – Pp. 761–773.
2. **Barron D. H.** The results of unilateral pyramidal section in the rat // *J. Comp. Neurol*, 1934. – Vol. 60. – Pp. 45–56.
3. **Schwab M. and Brosamli Ch.** Regeneration of lesioned corticospinal tract fibers in the adult rat spinal cord under experimental conditions // *Spinal Cord*, 1997. – Vol. 35. – Pp. 469–473.
4. **Bomze H. M., Bulsara K. R., Iskander B. J., Caroni Pand Skene J. H.** Spinal axon regeneration evoked by replacing two growth cone proteins in adult neurons // *Nat. Neurosci*, 2001. – Vol. 4. – Pp. 38–43.
5. **Фанарджян В. В., Геворкян О. В., Маллина Р. К., Мелик-Мусян А. Б., Меликсетян И. Б.** Динамика изменений инструментальных условных рефлексов у крыс после перерезки кортикоспинального тракта и удаления сенсомоторной области коры мозга // *Российский физиол. журн. им. И. М. Сеченова*, 2001. – Т. 87. – № 2. – С. 145–154.
6. **Фанарджян В. В., Геворкян О. В., Маллина Р. К., Мелик-Мусян А. Б., Меликсетян И. Б.** Эффекты пирамидотомии на инструментальные рефлексы у крыс в зависимости времени ее проведения // *Журн. высш. нерв. деятельности*, 2001. – Т. 51. – № 4. – С. 507–510.
7. **Fanardjian V. V., Gevorkyan O. V., Mallina R. K., Melik-Moussian A. B. and Meliksetyan I. B.** Enhanced Behavioral Recovery from Sensorimotor Cortex Lesions after pyramidotomy in Adult Rats // *Neural Plasticity*, 2000. – Vol. 7. – N 4. – Pp. 261–277.

8. **Fanardjian V. V., Papoyan E. V., Hovhannisyan E. A., Melik-Moussian A. B., Gevorkyan O. V. and Pogossian V. I.** The role of some Brain Structures in the Switching of the descending influences in operantly conditioned rats // *Neuroscience*, 2000. – Vol. 98. – N 2. – Pp. 385–395.
9. **Li S. and Strittmatter S. M.** Delayed systemic Nogo-66 receptor antagonist promotes recovery from spinal cord injury // *J. Neurosci*, 2003. – N 23. – Pp. 4219–4227.
10. **Maier I. and Schwab M.** Sprouting, regeneration and circuit formation in the injured spinal cord: factors and activity // *Phil. Trans. R. Soc. B*, 2006. – Vol. 361. – Pp. 1611–1634.
11. **Kennedy P.R., Humphry D.R.** The compensatory role of the parvocellular divisions of the red nucleus in operantly conditioned rats // *Neurosci. Res.*, 1987. – Vol. 5. – Pp. 39–62.
12. **Barron K. D., Dentinger M. P., Popp A. I. and Mankes L.** Neurons of layer of Vb of rat sensorimotor cortex atrophy but do not die after thoracic cord transection // *Exp. Neurol*, 1988. – Vol. 47. – Pp. 63–74.
13. **Иванов Ю. И., Погорелюк О. Н.** Обработка результатов медикобиологических исследований. – М.: Медицина, 1990. – 224 с.
14. **Геворкян О. В., Меликсетян И. Б., Овсепян А. С., Сагиян А. С.** Эффекты ВТ-меланина на восстановление условных рефлексов у крыс, перенесших удаление сенсомоторной коры // *Ж. высшей нервной деятельности*, 2006. – Т. 56, № 3. С. 384–391.
15. **Геворкян О. В., Меликсетян И. Б., Петросян Т. Р., Аветисян С. В., Овсепян А. С., Агаджанян А. Е., Манвелян Л. Р.** Восстановление инструментальных условных рефлексов у крыс после разрушения латерального ядра мозжечка и при воздействии бактериального меланина // *Сб. структурно-функциональные, нейрохимические закономерности асимметрии и пластичности мозга*, Москва. – 2007. – С. 178–181.
16. **Faucheux B., Martin M., Beaumont C., Hauw J., Agid Y. and Hirsch E.** Neuromelanin associated redox-active iron is increased in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease // *Journal of Neurochemistry*, 2003. – Vol. 86. – Pp. 1142 – 1148.
17. **Sulzer D., Bogulavsky J., Larsen K., Behr G., Karatekin E., Kleinman M., Turro N., Krantz D., Edwards R., Greene L. and Zecca L.** Neuromelanin biosynthesis is driven by excess cytosolic catecholamines not accumulated by synaptic vesicles // *Proc. Natl. Acad Sci USA*, 2000. – Vol. 97. – Pp. 11869–11874.
18. **Mc Graw J., Hiebert G.W. and Steeves J.** Modulating astrogliosis after neurotrauma // *Journal of Neuroscience Research*, 2001. – Vol. 63. – Pp. 109–115.
19. **Fawcett J., Asher R.** The glial scar and central nervous system repair // *Brain research Bulletin* 1999. – Vol. 49. – N 6. – Pp. 377–391.
20. **Bianco R., Rimunicci M., Gronthos S. and Robey P.** Bone marrow stromal stem cells *Nature, Biology and Potential Applications* // *Stem Cells*, 2001. – Vol. 96. – Pp. 180–192.
21. **Карамян А. И.** Эволюция конечного мозга позвоночных / *Наука*, 1976. – 250 с.
22. **Саркисян Дж. С., Галоян А. А., Камалян Р. Г., Чавушян В. А., Меликсетян И. Б., Погосян М. В., Геворкян О. В., Овсепян А. С., Авакян З. Е., Казарян С. А. и Манучарян М. К.** Действие бактериального меланина на электрическую активность черной субстанции в условиях генерации ГАМК // *Нейрохимия*, 2007. – Т. 24. – С. 239–247.
23. **Галоян А.А.** Стволовые клетки в генетических механизмах нейрогенеза и гематогенеза // *Нейрохимия*, 2004. – Т. 21. – №3. – С. 183–189.

© T. R. Petrosyan, O. V. Gevorgyan

UDC 616.8.092

EFFECTS OF BACTERIAL MELANIN ON POSTTRAUMATIC RECOVERY OF MOTOR TRACT CONDUCTION IN RATS

T. R. Petrosyan, O. V. Gevorgyan (Yerevan, Armenia)

Unilateral destruction of Pyramidal tract on the bulbar level, conducted in rats initially trained to an instrumental conditioned reflex (ICF) and in rats not trained to ICR, results in contralateral hemiparesis. On the next day of the surgery part of the trained and not trained animals was injected intramuscularly with bacterial melanin solution at the rate 6mg/ml (170mg/kg). Comparison of recovery periods for ICR and paralyzed hindlimb movements in rats treated with melanin and in control animals, not injected with bacterial melanin, showed significant acceleration of posttraumatic recovery in melanin treated group. This proves the neuroprotective action of bacterial melanin on the process of motor recovery.

Keywords: *instrumental conditioned reflex, rats, corticospinal system, bacterial melanin.*

REFERENCES

1. **Chen R., Cohen L. G. Hallet M.** Nervous system reorganization following injury // *Neuroscience*, 2002. – Vol. 111. – Pp. 761–773.
2. **Barron D. H.** The results of unilateral pyramidal section in the rat // *J. Comp. Neurol*, 1934. – Vol. 60. – Pp. 45–56.
3. **Schwab M. and Brosamla Ch.** Regeneration of lesioned corticospinal tract fibers in the adult rat spinal cord under experimental conditions // *Spinal Cord*, 1997. – Vol. 35. – Pp. 469–473.
4. **Bomze H. M., Bulsara K. R., Iskander B. J., Caroni Pand Skene J. H.** Spinal axon regeneration evoked by replacing two growth cone proteins in adult neurons // *Nat. Neurosci*, 2001. – Vol. 4. – Pp. 38–43.
5. **Fanardjian V. V., Gevorgyan O. V., Mallina R. K., Melik-Musyan A. B., Meliksetyan I. B.** Dynamics of instrumental reflex changes following transection of the corticospinal tract and ablation of the cerebral cortex sensorimotor region in rats. // *I. M. Sechenov Russian Physiological Journal*, 2001. – Vol. 87. – № 2. – Pp. 145–154.
6. **Fanardjian V. V., Gevorgyan O. V., Mallina R. K., Melik-Musyan A. B., Meliksetyan I. B.** Effects of pyramidotomy on instrumental reflexes in rats depend on the duration of its execution. // *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlov*, 2001. – Vol. 51. – № 4. – Pp. 507–510.
7. **Fanardjian V. V., Gevorgyan O. V., Mallina R. K., Melik-Moussian A. B. and Meliksetyan I. B.** Enhanced Behavioral Recovery from Sensorimotor Cortex Lesions after pyramidotomy in Adult Rats // *Neural Plasticity*, 2000. – Vol. 7. – N 4. – Pp. 261–277.
8. **Fanardjian V. V., Papoyan E. V., Hovhannisyan E. A., Melik-Moussian A. B., Gevorgyan O. V. and Pogossian V. I.** The role of some Brain Structures in the Switching of the descending influences in operantly conditioned rats // *Neuroscience*, 2000. – Vol. 98. – N 2. – Pp. 385–395.
9. **Li S. and Strittmatter S. M.** Delayed systemic Nogo-66 receptor antagonist promotes recovery from spinal cord injury // *J. Neurosci*, 2003. – N 23. – Pp. 4219–4227.

10. **Maier I. and Schwab M.** Sprouting, regeneration and circuit formation in the injured spinal cord: factors and activity // Phil. Trans. R. Soc. B, 2006. – Vol. 361. – Pp. 1611–1634.
11. **Kennedy P.R., Humphry D.R.** The compensatory role of the parvocellular divisions of the red nucleus in operantly conditioned rats // Neurosci. Res., 1987. – Vol. 5. – Pp. 39–62.
12. **Barron K. D., Dentinger M. P., Popp A. I. and Mankes L.** Neurons of layer of Vb of rat sensorimotor cortex atrophy but do not die after thoracic cord transection // Exp. Neurol, 1988. – Vol. 47. – Pp. 63–74.
13. **Ivanov Y., Pogorelyuk. O.** Data processing in biomedical research / M.: Medicina, 1990. pp. 224.
14. **Gevorgyan O. V., Meliksetyan I. B., Hovsepyan A. S., Saghyan A. S.** Effects of BT- melanin on recovery of conditioned reflexes after sensorimotor cortex ablation in rats. // Journal of Higher Nervous Activity, 2006. – Vol. 56. – № 3. – Pp. 384–391.
15. **Gevorkyan O. V., Meliksetyan I. B., Petrosyan T. R., Avetisyan S. V., Hovsepyan A. S. Agadjanyan A. E., Manvelyan L. R.** Recovery of instrumental conditioned reflexes in rats after destruction of lateral cerebellar nucleus and influence of bacterial melanin // Proceedings of conference: "Morphofunctional, neurochemical regularities of brain asymmetry and plasticity", 2007. – Moscow. – Pp. 178–181.
16. **Faucheux B., Martin M., Beaumont C., Hauw J., Agid Y. and Hirsch E.** Neuromelanin associated redox-active iron is increased in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease // Journal of Neurochemistry, 2003. – Vol. 86. – Pp. 1142–1148.
17. **Sulzer D., Bogulavsky J., Larsen K., Behr G., Karatekin E., Kleinman M., Turro N., Krantz D., Edwards R., Greene L. and Zecca L.** Neuromelanin biosynthesis is driven by excess cytosolic catecholamines not accumulated by synaptic vesicles // Proc. Natl. Acad Sci USA, 2000. – Vol. 97. – Pp. 11869–11874.
18. **Mc Graw J., Hiebert G.W. and Steeves J.** Modulating astrogliosis after neurotrauma // Journal of Neuroscience Research, 2001. – Vol. 63. – Pp. 109–115.
19. **Fawcett J., Asher R.** The glial scar and central nervous system repair // Brain research Bulletin 1999. – Vol. 49. – N 6. – Pp. 377–391.
20. **Bianco R., Rimunici M., Gronthos S. and Robey P.** Bone marrow stromal stem cells Nature, Biology and Potential Applications // Stem Cells, 2001. – Vol. 96. – Pp. 180–192.
21. **Karamyan A. I.** The evolution of telencephalon in vertebrates, 1976. – Nauka. – Pp.250.
22. **Sargisyan J. S., Galoyan A. A., Kamalyan R. G., Chavushyan V. A., Meliksetyan I. B., Pogosyan M. V., Gevorgyan O. V., Hovsepyan A. S., Avagyan Z. E., Kazaryan S. A. and Manucharyan M. K.** Action of bacterial melanin on electrical activity of Substantia Nigra in conditions of GABA generation. // Neurokhimia, 2007. – T 24. – C. 239–247.
23. **Galoyan A. A.** Stem cells in genetic mechanisms of neurogenesis and hematogenesis. // Neurokhimia, 2004. – Vol. 21. – № 3. – Pp. 183–189.

Tigran R. Petrosyan – Associate professor at department of Kinesiology. Armenian State Institute of Physical Education.

Olga V. Gevorgyan – Research Associate. Laboratory of CNS. Institute of Physiology, National Academy of Sciences, Republic of Armenia.

© А. Ш. Рузиев, О. У. Муротов, У. К. Ибрагимов

УДК 616.1277 + 005.4

АНТИОКСИДАНТНАЯ СИСТЕМА СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЙ ПЕЧЕНИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ИНСУЛЬТЕ*

А. Ш. Рузиев, О. У. Муротов, У. К. Ибрагимов (Ташкент, Узбекистан)

Изучена антиокислительная активность митохондриальной и микросомальной фракций гепатоцитов в динамике экспериментального инсульта. В микросомальной фракции печени после ишемии реперфузии головного мозга наблюдалось увеличение антиперекисной активности и снижение активности супероксиддисмутазы, на фоне увеличения содержания малонового диальдегида и среднемолекулярных пептидов. В митохондриальной фракции печени активность ферментов антиперекисной системы увеличивалась и отмечалось снижение фермента антирадикальной защиты с наибольшим отклонением до 6 часов после реперфузии.

Ключевые слова: антиоксидантная система митохондрии, микросомы, инсульт.

Актуальность проблемы.

Цереброваскулярная болезнь, приводящая к острым и хроническим формам сосудисто-мозговой недостаточности в настоящее время становится основной социально-медицинской проблемой не только клинической неврологии, но и общества. В экономически развитых странах инсульт занимает 3-е место в структуре

заболеваемости и смертности после сердечно-сосудистой и онкологической патологии. На сегодняшний день около 9 млн человек страдают цереброваскулярными заболеваниями. В последние годы в нашей стране отмечается увеличение частоты острых инсультов. Инсульт и хроническая ишемия головного мозга, являются в настоящее время, наряду с тяжелыми травмами, ведущими причинами инвалидизации [8].

* Статья подготовлена по результатам работы Международной научно-практической конференции «Свободные радикалы и антиоксиданты в химии, биологии и медицине» (1-4 октября 2013 г.) в рамках реализации Программы стратегического развития ФГБОУ ВПО «Новосибирский государственный педагогический университет» на 2012–2016 гг.

Рузиев Адхам Шухрат угли – бакалавр педиатрического факультета, Ташкентский педиатрический медицинский институт.

E-mail: uk_ibragimov@rambler.ru

Муротов Облокул Уматович – ассистент кафедры гистологии, Ташкентский педиатрический медицинский институт.

E-mail: uk_ibragimov@rambler.ru

Ибрагимов Уткур Кудратович – доктор медицинских наук, профессор кафедры биохимии, Ташкентский педиатрический медицинский институт

E-mail: uk_ibragimov@rambler.ru

Прогрессирующий, лавинообразный рост цереброваскулярной патологии приводит к значительному росту не только острых инсультов, но и числа пациентов с хронической ишемией головного мозга. При продолжительной и тяжелой ишемии развиваются необратимые повреждения нейронов; последние гибнут по механизму некроза и (с некоторой задержкой во времени) апоптоза. Известно, что при ишемии головного мозга наблюдается перераспределение кислорода в организме в пользу головного мозга. Снижается парциальное давление во внутренних органах, в частности в печени и почках, что способствует мощной генерации активных форм кислорода (АФК) компонентами дыхательной цепи (сначала образуется супероксид, затем перекись водорода). Таким образом, изменения гемциркуляции, особенно после реперфузии головного мозга не могут не сказаться на состоянии органов и тканей, что неизбежно отразится в виде различных морфологических и биохимических изменений во всём организме, в частности в печени. *Целью настоящего исследования* явилось изучение генерации АФК в субклеточных фракциях гепатоцитов при экспериментальной ишемии головного мозга. *Материалы и методы исследования.* Исследования проведены на белых беспородных крысах самцах, исходной массой 120-130 грамм. Модель ишемии головного мозга воспроизводилась методом клипирования левой сонной артерии на протяжении 40 минут. В качестве контроля служили животные «ложнооперированные», которым вскрывали сонную артерию под эфирным наркозом с последующим послойным ушиванием ($n=6$). Забой животных проводили в сроки 1,3,6,12,24,72 часа после реперфузии.

Верификацию ишемии проводили на основании морфологических исследований (окраска нитратом серебра по методу Ниссля) [7]. Субклеточные фракции из гомогената печени выделяли методом дифференциального центрифугирования. Количество малонового диальдегида (МДА) определяли по методу [6], количество среднемолекулярных пептидов (СМП) по методу Габриэлян Н. И. [2]. Суммарную антипероксидную активность (АПА) по методу Королук М. А. [4], активность супероксиддисмутазы (СОД) по методу Бурсова О. С. [1].

Полученные результаты и их обсуждение. Сравнение активности ферментов АПА и СОД в митохондриальной (МХ) и микросомальной (МС) фракциях печени группы ложнооперированных животных через 1 час после ишемии реперфузии головного мозга показало повышение АПА относительно интактной группы животных в 1,28 раза ($P<0,05$) и снижение активности СОД в 1,12 раза ($P>0,05$). В остальные сроки исследования обнаружено отсутствие достоверных изменений ложнооперированных крыс и интактных в связи с чем данные результаты объединены как контрольные. Изменение активности ферментов МХ фракции носили экстремальный характер: для АПА с максимумом в 2,01 и СОД с минимумом в 3,49 раза в первые часы после ишемии реперфузии. В ранние сроки ишемии реперфузии обнаружена аналогичная тенденция и для МС фракции гепатоцитов, имеющий экстремальный характер с максимумом для АПА и минимумом для СОД в ранние часы после реперфузии. Уменьшение активности фермента антирадикальной защиты было в 3,27 раза меньше по сравнению с контролем. В МС

фракции повышение активности АПА было менее выраженным и было в 1,76 раза выше показателя контроля.

При клинических исследованиях у новорожденных с гипоксически ишемической энцефалопатией в крови обнаружено увеличение активности СОД, сопровождавшееся снижением активности каталазы [8]. Экспериментальные исследования активности СОД в МХ фракции печени крыс при ишемии реперфузии головного мозга показал временную зависимость изменений от сроков реперфузии [9]. Обнаружены определенные временные параметры морфологических изменений в печени после ишемии реперфузии головного мозга в эксперименте [10].

Ишемия с последующей реперфузией приводит к изменениям в системе антирадикальной и антипероксидной активности организма, выраженные как в ткани головного мозга, так и в печени. СОД и каталаза, являясь мощным антиокислительным тандемом, обеспечивают защиту от супероксиданиона и перекиси водорода, образующихся как внутри клеток, так и во внеклеточном пространстве, поддерживая оптимальный для жизнедеятельности уровень генерации активных форм кислорода (АФК). При этом защита клеточных структур от повреждающего действия АФК, продуцирующихся внутри клетки (эндогенные АФК) и воздействующих извне (экзогенные АФК) организуется различным образом.

Изменения в антиокислительной системе, вероятно, были связаны и с усилением генерации АФК. Так содержание МДА в МС фракции в первые 6 часов после ишемии реперфузии было больше контроля (ложнооперированная группа) в 3,10 раза и больше показателя интактных крыс в 6,24 раза. Содержание СМП в первые часы после

реперфузии было выше контроля в 4,06 раза и больше показателя интактных крыс в 8,64 раза.

В МХ фракции наблюдалась аналогичная тенденция, и через 6 часов после реперфузии обнаружено максимальное содержание МДА, которое было больше контроля в 5,79 раза и больше аналогичного показателя интактной группы в 7,91 раза ($P > 0,05$), которое к 72 часам не нормализовалось. Содержание СМП было в первые 6 часов выше контроля в 3,72 раза и больше показателя интактной группы в 6,89 раза. В последующие сроки исследования содержание МДА и СМП не достигало значения контроля. Рассматривая механизмы изменений активности ферментов антирадикальной и антипероксидной защиты печени можно отметить, одной из ведущих причин, видимо, является перераспределение кислорода в организме экспериментального животного в пользу пораженного органа. По мнению Петрухина А.С. [5] в ответ на гипоксию в тканях мозга повышается скорость кровотока с увеличением минутного объема, а общий кровоток в первые часы перераспределяется так, чтобы сохранить обеспечение кислородом головного мозга, «обкрадывая» внутренние органы [5]. Определенно, происходит снижение парциального давления в печени, что, видимо и явилось причиной активации образования АФК и соответствующего сдвига в антиокислительной системе МС и МХ фракций гепатоцитов [4] в различные сроки ишемии реперфузии головного мозга. Видимо, морфологические изменения в печени обнаруженные авторами [10] в ранние сроки ишемии реперфузии головного мозга связано со снижением активности антипероксидной и антирадикальной систем

защиты в первые 6 часов после реперфузии.
Выводы.

Изучена антиокислительная активность митохондриальной и микросомальной фракций гепатоцитов в динамике экспериментального инсульта. В микросомальной фракции печени после ишемии реперфузии головного мозга наблюдалось увеличение антиперекисной активности и снижение активности

супероксиддисмутазы, на фоне увеличения содержания малонового диальдегида и среднемолекулярных пептидов. В митохондриальной фракции печени активность ферментов антипероксидной системы увеличивалась и отмечалось снижение фермента антирадикальной защиты с наибольшим отклонением до 6 часов после реперфузии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Брусов О. С., Герасимов А. И., Панченко Л. Ф. Влияние природных ингибиторов радикальных реакций на автоокисление адреналина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1976. – 87(1). – С. 33–35.
2. Габриэлян Н. И., Дмитриев А. А., Кулаков Г. П., Мекикян А. М., Щербанева О. И. Диагностическая ценность определения средних молекул в плазме крови при нефрологических заболеваниях // Клиническая медицина. – 1981. – Т. LIX. – № 10. – С. 38–42.
3. Ибрагимов У. К., Хайбуллина З. Р. Апоптоз. Учебное пособие. – Ташкент. – 2007. – 81 с.
4. Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г., Токарев В. Ф. Метод определения каталазы // Лаб. Дело. – 1988. – С. 16–19.
5. Клиническая детская неврология / под ред. А. С. Петрухина: Руководство. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2008. – 1088 с.
6. Нагоев Б. С., Тулупова М. В. Изучение прооксидантных свойств плазмы крови псориазом по уровню малонового диальдегида // Клиническая лабораторная диагностика. – 2008. – № 8. – С. 15–17.
7. Пирс Э. Гистохимия. – М., 1962. – 648 с.
8. Материалы II Российского международного конгресса «Цереброваскулярная патология и инсульт» – 2010.
9. Ergashev J. D., Sigatullina M. I., Ibragimov U. K. Neuropsychic growth of children with hypoxi – ischemic encephalopathy. // The 2th World Congress of Neonatology. – 6th – 9th January, 2010. – Luxor, Egypt. – p. 19.
10. Ibragimov U. K. Hypoxi- ischemic encephalopathy in children // The 2th World Congress of Neonatology. – 6th – 9th January, 2010. – Luxor, Egypt. – p. 18.
11. Muresanu D. F. Neurotrophic factors. – Bucuresti: Libripress, 2003., 268p.
12. Sloviter R. Apoptosis: a guide for perplexed // Trends Pharmacol Sci. – 2002. – Vol. 23. – P. 19–24.

© F. Sh. Ruziev, O. U. Murotov, U. K. Ibragimov

UDC 616.127-005.4

ANTIOXIDANT SYSTEM OF SUBCELLULAR FRACTION OF HEPATOCYTS AFTER EXPERIMENTAL STROKE

F. Sh. Ruziev, O. U. Murotov, U. K. Ibragimov (Tashkent, Uzbekistan)

It is studied antiperoxyde activity mitochondrial and microsomal fraction of hepatocytes in speaker experimental stroke. In microsomal of the fractions liver increase existed after ischemia-reperfusion of brain antiperoxyde activity and reduction to activities superoxyd dismutase, on background of the increase the contents malon dialdehyds and middle molekular peptide. In mitochondrial of the fractions liver activity ferment antiperoxyde of the system increased and was noted reduction of the ferment antiradical protection with most deflection before 6 hours after reperfusion.

Keywords: *antioxidant system, mitochondria, microsomal fraction, stroke.*

REFERENCES

1. **Brusov O. S., Gerasimov A. I., Panchenko L. F.** Influence natural inhibitors of radical reactions to autooxidation of adrenaline // The bulletin experimental biology and medicine. – 1976. – 87(1). – pp. 33–35.
2. **Gabrieljan N. I., Dmitriev A. A., Kulakov G. P., Mekikyan A. M., Shcherbaneva O. I.** Diagnostic value of definition of average molecules in plasma of blood at nephrological diseases // Clinical medicine. – 1981. – Vol. LIX. – N 10. – pp. 38–42.
3. **Ibragimov U. K., Haibullina Z. R.** Apoptosis. The Manual. – Tashkent. – 2007. – 81 p.
4. **Koroljuk M. A., Ivanova L. I., Majorova I. G., Tokarev V. F.** Method of definition of katalas // Laboratory business. – 1988. – pp. 16–19.
5. **Clinical children's neurology** / ed. A.S.Petruhina: the Management. – M.: Publishing house "Medicine", 2008. – 1088 p.
6. **Nagoev B. S., Tulupova M. V.** Studying pro-oxidizer properties of plasma of blood of psoriasis // Clinical laboratory diagnostics. – 2008. – № 8. – pp. 15–17.
7. **Pirs E.** Histochemistry. – M., 1962. – 648 p.
8. **Materials II** the Russian international congress «Cerebrovascular pathology and an insult». – 2010.
9. **Ergashev J. D., Sigatullina M. I., Ibragimov U. K.** Neuropsychic growth of children with hypoxi – ischemic encephalopathy // The 2th World Congress of Neonatology. -6th – 9th January, 2010, – Luxor, Egypt. – p.19.
10. **Ibragimov U. K.** Hypoxi-ishemic encephalopathy in children //The 2th World Congress of Neonatology. -6th – 9th January, 2010. – Luxor, Egypt. – p.18.
11. **Muresanu D. F.** Neurotrophic factors. – Bucuresti : Libripress, 2003. – 268 p.
12. **Sloviter R.** Apoptosis: a guide for perplexed // Trends Pharmacol Sci. – 2002. – Vol. 23. – P. 19–24.

Ruziev Adham Shuhrat ugly – the bachelor of pediatric faculty, Tashkent pediatric medical institute.

E-mail: uk_ibragimov@rambler.ru

Murotov Oblokul Ummatovich – the assistant to faculty of histology, Tashkent pediatric medical institute.

E-mail: uk_ibragimov@rambler.ru

Ibragimov Utkur Kudratovich – the doctor of medical sciences, the professor of faculty of Biochemistry, Tashkent Pediatric Medical Institute.

E-mail: uk_ibragimov@rambler.ru

© И. В. Русских, С. И. Писарева, Н. В. Рябова

УДК 543.42 + 678.01

СПЕКТРАЛЬНОЕ ПРОЯВЛЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГИДРОКСИЛЬНЫХ ГРУПП ФЕНОЛОВ – АНТИОКСИДАНТОВ С РАСТВОРИТЕЛЯМИ

И. В. Русских, С. И. Писарева, Н. В. Рябова (Томск, Россия)

В статье исследованы спектрально-структурные характеристики пространственно-затрудненных фенолов в хлорсодержащих и ароматических растворителях методом ИК-спектроскопии. Цель работы – исследование спектральных проявлений водородных связей гидроксильных групп пространственно-затрудненных фенолов с хлорсодержащими и ароматическими углеводородами. Известно, что в фенолах экранирование объемными заместителями не позволяет гидроксильным группам образовывать межмолекулярные водородные связи. Именно этим обусловлен выбор таких структур в качестве присадок, ингибирующих окисление углеводородов. Тем не менее, введение пространственно-затрудненных фенолов в углеводородную систему может повлиять на установившийся порядок межмолекулярных взаимодействий и изменить спектральные характеристики фенолов. В работе было обнаружено, что при равных концентрациях фенолов полосы поглощения растворов в диапазоне $3700\text{--}3200\text{ см}^{-1}$ отличаются по интенсивности и по положению максимумов в зависимости от полярности и типа растворителя. Изменения спектральных характеристик обусловлены межмолекулярными взаимодействиями гидроксильных групп фенолов с растворителями.

Ключевые слова: пространственно-затрудненные фенолы, хлорсодержащие и ароматические растворители, межмолекулярные и внутримолекулярные взаимодействия, ИК-спектроскопия, водородные связи.

* Статья подготовлена по результатам работы Международной научно-практической конференции «Свободные радикалы и антиоксиданты в химии, биологии и медицине» (1-4 октября 2013 г.) в рамках реализации Программы стратегического развития ФГБОУ ВПО «Новосибирский государственный педагогический университет» на 2012–2016 гг.

Русских Ирина Владимировна – кандидат химических наук, научный сотрудник, лаборатория природных превращений нефти, Институт химии нефти Сибирского отделения Российской академии наук.

E-mail: rus@ipc.tsc.ru

Писарева Светлана Ивановна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник, лаборатория реологии нефти, Институт химии нефти Сибирского отделения Российской академии наук.

E-mail: LRN@ipc.tsc.ru

Рябова Наталья Викторовна – ведущий инженер, лаборатория физико-химических методов исследования, Институт химии нефти Сибирского отделения Российской академии наук.

E-mail: rnv@ipc.tsc.ru

Введение.

Наиболее распространенными ингибиторами, применяемыми для предотвращения окисления различных углеводородных систем – моторных топлив, смазочных масел, пищевых продуктов, полимерных материалов и покрытий, являются соединения класса пространственно-затрудненных фенолов (ПЗФ) [1]. Известно, что в фенолах экранирование объемными заместителями не позволяет гидроксильным группам образовывать межмолекулярные водородные связи [2]. Именно этим обусловлен выбор таких структур в качестве присадок, ингибирующих окисление углеводородов. Тем не менее, введение ПЗФ в углеводородную систему может повлиять на установившийся порядок межмолекулярных взаимодействий и изменить спектральные характеристики фенолов. В работе [3] методом ИК спектроскопии изучено влияние химической природы растворителя на образование межмолекулярных водородных связей с нефтяными фенолами.

Цель работы – исследование спектральных проявлений водородных связей гидроксильных групп ПЗФ с хлорсодержащими и ароматическими углеводородами.

Объекты и методы исследования.

В качестве объектов исследования выбраны 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метил-фенол

(ионол) – соединение, в котором содержится одна реакционноспособная гидроксильная группа, экранированная с двух сторон *трет*-бутильными заместителями, и 2,2'-метилена-*бис*-(4-метил-6-*трет*-бутил-фенол) (БФ) – соединение, в котором содержатся две реакционноспособные гидроксильные группы, экранированные с двух сторон *трет*-бутильными заместителями.

ИК спектры поглощения растворов ПЗФ регистрировали на ИК-Фурье спектрометре Nicolet 5700 (разрешение 4 см^{-1} , число сканов пробы 64) в диапазоне $3700\text{--}3200\text{ см}^{-1}$, в кюветах из NaCl с толщиной поглощающего слоя 0,216 мм. В работе использовали две группы растворителей: хлорсодержащие (четырёххлористый углерод (CCl_4), хлороформ (CHCl_3), хлористый метилен (CH_2Cl_2)) и ароматические углеводороды (бензол, толуол, кумол). Растворители подвергали очистке по общепринятым методикам [4]. Концентрации используемых в работе фенолов составили $0,18 \cdot 10^{-3}$ моль.

Результаты и их обсуждение.

Характеристика ИК полос поглощения гидроксильных групп растворов ионола и БФ в хлорсодержащих и ароматических растворителях приведена в таблицах 1, 2.

Таблица 1.

Характеристика ИК полос поглощения гидроксильных групп растворов ионола.

Растворитель	ν , см^{-1}	Оптическая плотность ИК поглощения ОН (своб.)
Четырёххлористый углерод (CCl_4)	3649	0,34
Хлороформ (CHCl_3)	3643	0,29
Хлористый метилен (CH_2Cl_2)	3638	0,24
Бензол (C_6H_6)	3637	0,23
Толуол (C_7H_8)	3637	0,23
Кумол (C_9H_{12})	3643	0,19
<i>Примечание:</i> ν – частота максимума полосы поглощения в ИК спектрах растворов ионола в области валентных колебаний ОН-группы		

Таблица 2.
Характеристика ИК полос поглощения гидроксильных групп растворов БФ.

Растворитель	ν , см^{-1}	Оптическая плотность в областях спектра ИК поглощения			
		ОН (своб.)	ОН... π связь	ОН (внутримол.)	ОН (межмол.)
Четырёххлористый углерод (CCl_4)	3631, 3508, 3440	0,32	-	0,69	0,31
Хлороформ (CHCl_3)	3622, 3508, 3438	0,46	-	0,33	0,38
Хлористый метилен (CH_2Cl_2)	3620, 3508, 3435	0,60	-	0,42	0,54
Бензол (C_6H_6)	3612, 3573, 3504, 3427	0,39	0,26	0,59	0,44
Толуол (C_7H_8)	3612, 3573, 3504, 3437	0,35	0,29	0,58	0,40
Кумол (C_9H_{12})	3610, 3573, 3504, 3437	0,31	0,27	0,63	0,39

Примечание: ν – частота максимума полос поглощения в ИК спектрах растворов БФ в области валентных колебаний ОН-группы

Фрагменты ИК спектров растворов ПЗФ в четыреххлористом углероде, хлороформе, бензоле, представленные на рисунках 1, 2 демонстрируют различные виды водородной связи, о чем свидетельствуют полосы поглощения в этой области: 3649-3637 см^{-1} для ионола, 3631-3612, 3573, 3508-3504,

3440-3427 см^{-1} для БФ. При равных концентрациях фенолов во всех растворителях полосы поглощения растворов как для ионола, так и для БФ, отличаются по интенсивности и по положению максимумов полос поглощения в зависимости от полярности и типа растворителя [5].

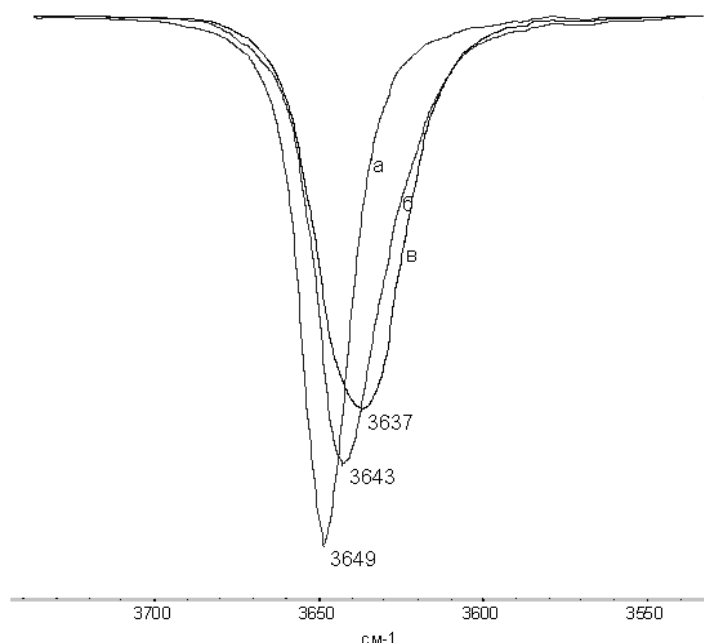
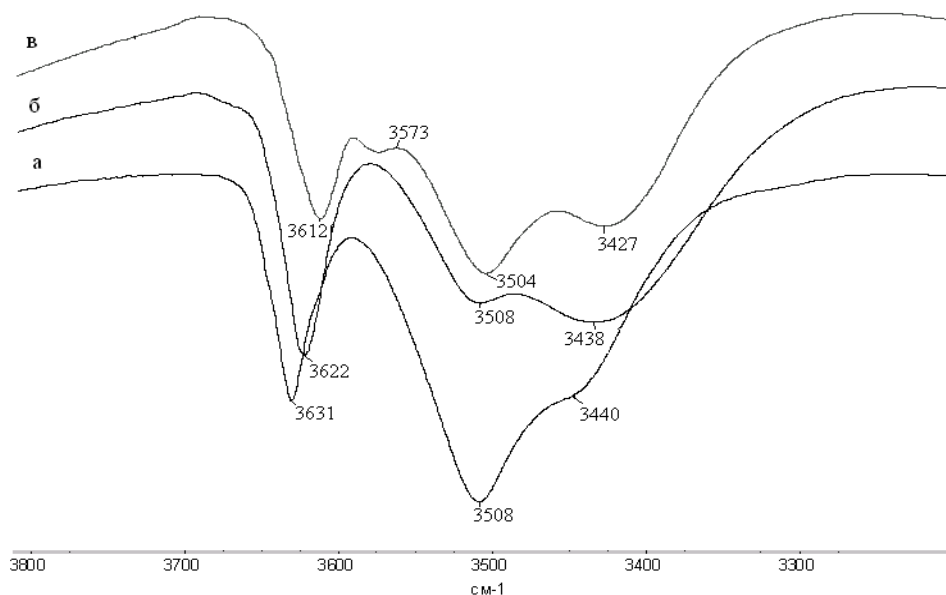


Рисунок 1.
*Фрагменты ИК спектров
Растворов ионола в четыреххлористом
углероде (а), в хлороформе (б)
и бензоле (в).*

Рисунок 2.

Фрагменты ИК спектров растворов БФ в четыреххлористом углероде (а), в хлороформе (б) и бензоле (в).



ИК спектры ионола во всех растворителях содержат одну полосу поглощения, соответствующую валентным колебаниям свободной гидроксильной группы (рис. 1, таблица 1), отличающуюся формой. Самая узкая и интенсивная полоса наблюдается в ИК спектре раствора ионола в CCl_4 , так как CCl_4 , имеющий дипольный момент, равный 0 [4], не образует межмолекулярных связей с ионолом, являясь инертной средой (рис. 1, а). Хлороформ и хлористый метилен с дипольными моментами 1,87 D (для CHCl_3), 1,6 D (для CH_2Cl_2) [4] являются активными полярными растворителями, кислые протоны которых взаимодействуют с гидроксильными группами ионола, что проявляется на спектре в виде более широкой полосы меньшей интенсивности, смещенной в область низких частот (рис. 1, б). Наиболее широкая и менее интенсивная, еще больше смещенная в длинноволновую область, полоса поглощения, наблюдаемая на рисунке 1, в, является спектральным проявлением межмолекуляр-

ного взаимодействия гидроксильных протонов ионола с π -электронной системой ароматических углеводородов ($\text{OH}\dots\pi$ взаимодействие). В таблице 1 представлены результаты влияния заместителей в ароматических кольцах растворителей на интенсивность и положение максимумов полос поглощения гидроксильной группы ионола. Для бензола и толуола эти значения равны, а для кумола наблюдается уширение и сдвиг полосы поглощения в высокочастотную область, что обусловлено пространственным эффектом метильных групп изопропилбензола. Влияние метильных групп в ароматических кольцах фенолов (на примере фенола, п-крезола, ионола) на межмолекулярное взаимодействие гидроксильных групп с π -электронной системой бензола представлено на рисунке 3. Как следует из рисунка, для п-крезола и фенола наблюдается существенное увеличение интенсивности и сдвиг полосы поглощения в область низких частот, что свидетельствует о более прочном $\text{OH}\dots\pi$ взаимодействии.

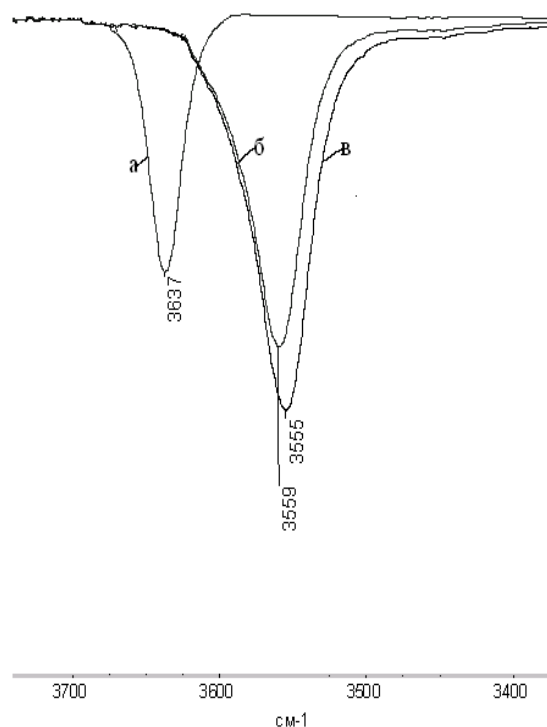


Рисунок 3.
Фрагменты ИК спектров растворов
ионола (а), п-крезола (б),
фенола (в) в бензоле.

ИК спектр раствора БФ в CCl_4 содержит узкую полосу поглощения свободной гидроксильной группы в области 3631 см^{-1} . Полоса поглощения 3508 см^{-1} , более интенсивная, чем при 3631 см^{-1} , свидетельствует о том, что большую долю водородной связи БФ в растворе CCl_4 составляет внутримолекулярная водородная связь между двумя гидроксильными группами. Положение максимума этой полосы не зависит от полярности растворителя (таблица 2). Полоса поглощения, смещенная в область низких частот - 3440 см^{-1} , характеризует валентные колебания гидроксильных групп в межмолекулярной водородной связи, так как при межмолекулярном взаимодействии влияние пространственного фактора меньше (больше степеней свободы во взаимном расположении двух молекул БФ относительно друг друга и связь $\text{O} \dots \text{H}$ прочнее). Положение максимума полосы межмолекулярной водородной связи зависит от полярности растворителя (таблица 2) [4].

Так, в инертном растворителе CCl_4 , полоса 3440 см^{-1} проявляется только в виде плеча на полосе 3508 см^{-1} (рис. 2, а).

ИК спектры растворов БФ в CHCl_3 и CH_2Cl_2 содержат узкие интенсивные полосы поглощения гидроксильной группы при 3622 и 3620 см^{-1} , соответственно (рис. 2 б, таблица 2). Увеличение интенсивности и сдвиг максимума полос поглощения гидроксильных групп в область низких частот, по сравнению с CCl_4 (3631 см^{-1}), с повышением полярности растворителя объясняется взаимодействием их с кислыми протонами CHCl_3 и CH_2Cl_2 . В этих растворах также присутствуют полосы поглощения в области 3508 см^{-1} , которые характеризуют внутримолекулярную водородную связь между гидроксильными группами. Увеличение интенсивности полос при 3438 и 3435 см^{-1} , отвечающих за межмолекулярную водородную связь гидроксильных групп БФ, а также стабильность максимума полос поглощения внутримолекулярной водородной связи вполне соответствуют

классическим представлениям о том, что увеличение полярности растворителя усиливает интенсивность процесса образования межмолекулярных водородных связей [5, 6].

В ИК спектрах БФ в ароматических растворителях наряду с вышеуказанными полосами поглощения появляется новая полоса 3573 см^{-1} меньшей интенсивности, которая является спектральным проявлением межмолекулярного взаимодействия гидроксильных протонов БФ с π -электронной системой ароматических углеводородов (ОН... π взаимодействие) (рис. 2, в, таблица 2). Теоретически эта связь должна усиливаться с увеличением подвижности р-электронов в ряду: $\text{C}_6\text{H}_6 < \text{C}_7\text{H}_8 < \text{C}_9\text{H}_{12}$ [5], однако влияние пространственного эффекта в изопропилбензоле меняет вышеуказанный теоретический ряд: $\text{C}_6\text{H}_6 < \text{C}_9\text{H}_{12} < \text{C}_7\text{H}_8$, что подтверждается значениями оптических плотностей полос поглощения (таблица 2).

Заключение.

Анализ спектральных характеристик растворов пространственно-затрудненных

фенолов показал, что на проявление межмолекулярных взаимодействий влияет тип и полярность растворителя. Так, CCl_4 не способствует образованию межмолекулярных водородных связей в растворах фенолов, являясь инертной средой. С повышением полярности хлорсодержащих растворителей наблюдается увеличение интенсивности и сдвиг максимума полос поглощения гидроксильных групп в область низких частот, что объясняется межмолекулярным взаимодействием их с кислыми протонами CHCl_3 и CH_2Cl_2 . В растворах ароматических углеводородов обнаружено межмолекулярное взаимодействие гидроксильных протонов фенолов с π -электронной системой ароматических углеводородов. В полярных хлорсодержащих и ароматических растворителях БФ содержит смесь соединений с внутримолекулярной (3504 см^{-1}) и межмолекулярной ($3573, 3427\text{ см}^{-1}$) водородных связей, находящихся в лабильном динамическом равновесии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Рогинский В. А.** Фенольные антиоксиданты. Реакционная способность и эффективность. – М.: Наука, 1988. – 247 с.
2. **Четкина Л. А., Соболев А. Н., Бельский В. К., Заводник В. Е., Арзаманова И. Г., Гурвич Я. А., Старикова О. Ф.** Строение фенольных стабилизаторов полимеров. VIII. Структура кристаллов моноакрилата 2,2'-метилена-бис-(4-метил-6-трет-бутил-фенола) // Журнал структурной химии. – 1991. – Т. 32. – № 5. – С. 162–164.
3. **Писарева С. И., Русских И. В.** Влияние природы растворителя на образование ассоциатов с внутри- и межмолекулярными водородными связями в растворах нефти // Нефтехимия. – 2012. – Т. 52. – № 3. – С. 191–195.
4. **Гордон А., Форд Р.** Спутник химика. – М.: Мир, 1976. – 541 с.
5. **Беллами Л.** Новые данные по ИК-спектрам сложных молекул / пер. с англ. В. М. Акимова, Э. Г. Тетерина // под ред. Ю. А. Пентина. – М.: Мир, 1971. – 318 с.
6. **Наканиси К.** Инфракрасные спектры и строение органических соединений / пер. с англ. Н. Б. Куплетской и Л. М. Эпштейн // под ред. А. А. Мальцева. – М.: Мир, 1965. – 21 с.

© I. V. Russkikh, S. I. Pisareva, N. V. Ryabova

UDC 543.42 + 678.01

SPECTRAL MANIFESTATION OF INTERACTION BETWEEN HYDROXYL GROUPS OF PHENOLIC ANTIOXIDANTS AND SOLVENTS

I. V. Russkikh, S. I. Pisareva, N. V. Ryabova (Tomsk, Russia)

The spectral and structural characteristics of sterically hindered phenols in chlorinated and aromatic solvents are analyzed by IR spectroscopy. The spectral manifestations of hydrogen bonds of the hydroxyl groups of sterically hindered phenols in chlorinated and aromatic hydrocarbons are investigated. It is known that hydroxyl groups are not capable of forming intermolecular hydrogen bonds in phenols due to their shielding by bulky substituents. It is exactly this fact that has motivated their selection as additives inhibiting hydrocarbon oxidation. Nevertheless, an introduction of sterically hindered phenols into the hydrocarbon system may affect the established pattern of intermolecular interactions and change the phenol spectral characteristics. The intensities and peak positions in the absorption bands of solutions are shown to differ within the range 3700–3200 cm⁻¹, depending on the solvent type and polarity, the concentrations of phenols being equal. The observed changes in the spectral characteristics are attributed to the intermolecular interactions between the phenol hydroxyl groups and solvents.

Keywords: *sterically hindered phenols, aromatic and chlorinated solvents, intermolecular and intramolecular interactions, IR spectroscopy, hydrogen bonds.*

REFERENCES

1. **Roginsky V. A.** Phenolic antioxidants. Reactivity and efficiency. – M.: Nauka, 1988. – 247 p. [In Russia]
2. **Chetkin L. A., Sobolev A. N., Belsky V. K., Zavodnik V. E., Arzamanova I. G., Gurvich J. A., Starikova O. F.** The structure of polymers phenolic stabilizers. VIII. Structure monoacrylate crystals of 2,2'-methylene-bis-(4-methyl-6-tert-butyl-phenol) // Journal of Structural Chemistry, 1991. – vol. 32. – No 5. – pp. 162–164. [In Russia]
3. **Pisareva S. I. and Russkikh I. V.** Effect of the Solvent Nature on the Formation of Intra- and Intermolecularly Hydrogen-Bonded Associates in Crude Oil Solutions // Petroleum Chemistry. 2012, vol. 52. – No. 3. – pp. 166–170.
4. **Gordon A., Ford R.** Satellite of chemist. – M.: Mir, 1976. – 541 p. [In Russia]
5. **Bellamy L.** New Data on the IR spekram of complex molecules / Translated from English Dr. V. M. Akimov and Dr. E. G. Teterina // Ed. Prof. Y. A. Pentyne. Springer-Verlag, 1971. – 318 p. [In Russia]
6. **Nakanisi K.** Infrared spectra and structure of organic compounds / Translated from English Dr. N. B. Kupletskaya and L. M. Epshtein // Ed. Dr. A. A. Maltseva. Springer-Verlag, 1965. – 216 p. [In Russia]

Russkikh Irina Vladimirovna – Doctor of Sciences (Chemistry), researcher, Laboratory of Natural Oil Transformations, Institute of Petroleum Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences.

E-mail: rus@ipc.tsc.ru

Pisareva Svetlana Ivanovna – Doctor of Sciences (Chemistry), senior researcher, Laboratory of Oil Rheology, Institute of Petroleum Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences.

E-mail: LRN@ipc.tsc.ru

Ryabova Natalia Viktorovna – advanced engineer, Laboratory of Physico-chemical Methods of Analysis, Institute of Petroleum Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences.

E-mail: rnv@ipc.tsc.ru

© О. А. Шосталь, А. А. Москалев

УДК 57 + 57.04

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЙ ОСВЕЩЕНИЯ НА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ ЛАБОРАТОРНЫХ ЛИНИЙ DROSOPHILA MELANOGASTER С МУТАЦИЯМИ В ГЕНАХ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ*

О. А. Шосталь, А. А. Москалев (Сыктывкар, Россия)

Свет является важным экологическим фактором, который постоянно воздействует на живые организмы в течение всей их жизни. Генетические механизмы влияния света на продолжительность жизни изучены слабо. Статья посвящена исследованию влияния различных условий освещения (24 ч, 12 ч, 0 ч) на продолжительность жизни линий дрозофилы с нарушением в генах цитоплазматической (Sod1) и митохондриальной (Sod2) супероксиддисмутазы. Обнаружено, что особи дрозофилы с низкой способностью детоксицировать свободные радикалы характеризуются более выраженной разницей между продолжительностью жизни в темноте и на свету по сравнению с особями линии дикого типа. При этом увеличение длины светового дня (с 12 ч до 24 ч) приводит к значительному снижению продолжительности жизни особей с мутациями в исследуемых генах. Данный результат указывает на опасность избыточного освещения. Показана роль генов супероксиддисмутазы в регуляции продолжительности жизни плодовой мушки *Drosophila melanogaster* в ответ на изменение длины светового дня.

Ключевые слова: продолжительность жизни, *Drosophila melanogaster*, световой режим, супероксиддисмутаза.

Введение

В процессах старения существенную роль отводят уровню метаболизма и сопутствующему ему оксидативному стрессу. Наиболее распространенной на сегодня

является точка зрения, согласно которой увеличение длины светового дня может приводить к более высокому уровню метаболизма вследствие интенсификации двигательной активности и изменения температуры

* Статья подготовлена по результатам работы Международной научно-практической конференции «Свободные радикалы и антиоксиданты в химии, биологии и медицине» (1-4 октября 2013 г.) в рамках реализации Программы стратегического развития ФГБОУ ВПО «Новосибирский государственный педагогический университет» на 2012–2016 гг.

Шосталь Ольга Андреевна – кандидат биологических наук, научный сотрудник, Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук.

E-mail: olash@list.ru

Москалев Алексей Александрович – доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной радиобиологии и геронтологии, Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук.

тела дрозофил [12–13]. Повышение уровня метаболизма, в свою очередь, приводит к дополнительному образованию токсичных побочных продуктов – свободных радикалов [7; 10], повреждающих митохондриальную и ядерную ДНК, мембраны и белки клетки [1; 6; 9], что в результате может привести к ускоренному старению и укороченной продолжительности жизни. В предыдущих наших работах было установлено [4–5], что линии дрозофилы с мутациями в генах репарации ДНК, белков теплового шока семейства 70 и белка сиртуина характеризуются более выраженной разницей между продолжительностью жизни в темноте и на свету по сравнению с линией дикого типа. Данный результат подтверждает важную роль исследуемых генов в устранении эффектов повреждающего действия света.

Супероксиддисмутаза является главным защитником клеток от свободных радикалов. Известно, что у дрозофилы, полностью потерявшей активность Cu/Zn-супероксиддисмутаза, продолжительность жизни снижается на 80 % [14], а введение в геном дрозофилы короткоживущей линии дополнительных генов супероксиддисмутаза и каталазы, основных ферментов антирадикальной защиты, приводило к повышению продолжительности жизни [11]. Недостаток митохондриальной супероксиддисмутаза у дрозофил и мышей также негативно сказывается на продолжительности жизни, тогда как сверхэкспрессия этого гена продлевает продолжительность жизни этих модельных организмов [8]. В данной работе мы решили проверить, будет ли свет оказывать свое повреждающее действие и будет ли изменяться продолжительность жизни в темноте и на свету у линий, с нарушениями в

генах митохондриальной и цитоплазматической супероксиддисмутаза.

Материал и методы исследования

В работе исследовали линию дикого типа *Canton-S* в качестве контрольной линии; линию *Sod1* – гетерозигота с мутацией гена цитоплазматической супероксиддисмутаза (генотип: *Sod^{m1}red¹/TM3,Sb¹Ser¹*) и линию *Sod2* – гетерозигота с мутацией гена митохондриальной супероксиддисмутаза (генотип: *y¹w^{*}; Sod2^{Delta02}/CyO*).

Условия эксперимента.

Культивирование родительских линий проводили в термостате при температуре 25⁰ С и стандартном 12 ч режиме освещения, в баночках 100 мл, содержащих 25 мл дрожжевой питательной среды. После появления имаго в течение суток производили отбор необходимого количества особей (50 штук на баночку), предварительно наркотизировав эфиром. Самцы и самки содержались отдельно. Общее количество баночек каждой линии было разделено на 3 группы. Первая группа исследуемых линий содержалась в условиях стандартного 12 ч освещения при интенсивности 120-130 лк от лампы дневного света, вторая группа – в условиях постоянного освещения (24 ч, 120-130 лк), третья группа – в условиях световой депривации (24 ч темнота, 0 лк). Подсчет числа умерших мух проводили ежедневно (за исключением субботы и воскресенья). Выживших мух еженедельно перемещали на свежую среду.

Статистическая оценка продолжительности жизни.

Для оценки достоверности различий по продолжительности жизни в темноте и на свету применяли непараметрические критерии Гехана-Бреслоу-Вилкоксона (для оценки различий медианной

продолжительности жизни) и Колмогорова-Смирнова (для сравнения кривых выживаемости) [2]. Для оценки статистической значимости различий 90%-ой гибели особей применяли метод Ванг-Аллисона [15]. Функции дожития оценивали с помощью процедуры Каплана-Мейера и представляли в виде кривых дожития [3] в программе Statistica 6.1 (Statsoft, США).

Результаты

При содержании особей контрольной линии дикого типа *Canton-S* в условиях стандартного 12-ти часового режима

освещения при интенсивности 120 лк медианная продолжительность жизни не изменялась (табл. 1), а в условиях круглосуточного режима освещения медианная продолжительность жизни изменилась только у самцов (снизилась на 12 %). В тоже время у особей линии *Sod1* с нарушением фермента цитоплазматической супероксиддисмутазы медианная продолжительность жизни при стандартном режиме освещения достоверно снизилась на 12 % у самцов и на 7 % у самок; при круглосуточном режиме освещения – на 37 % у самцов и у самок.

Таблица 1.

Параметры продолжительности жизни особей лабораторных линий дрозофилы при различных режимах освещения

Линия	Пол	Освещение, ч	М	СПЖ	90 %	min	max	N
<i>Canton-S</i>	♂♂	24 ч	56	51.2±0.6	66*	3	70	549
		12 ч	52*	51.5±0.5	66*	9	79	531
		0 ч	59	57.2±0.7	73	12	83	409
	♀♀	24 ч	56	52.1±0.6	66*	3	70	488
		12 ч	59	56.2±0.6	73*	4	81	506
		0 ч	52	56±0.7	77	5	84	469
<i>Sod1</i>	♂♂	24 ч	36*	30.8±0.8	59*	6	66	262
		12 ч	50*	46.2±0.7	61*	8	70	211
		0 ч	57	56.2±0.9	79	13	87	305
	♀♀	24 ч	36*	32.0±0.7	44*	6	56	245
		12 ч	53*	54.0±0.7	69*	8	73	235
		0 ч	57	57.5±0.9	74	9	89	237
<i>Sod2</i>	♂♂	24 ч	36*	35.4±0.7	54*	4	59	491
		12 ч	42*	42.5±0.6	58*	5	66	485
		0 ч	58	55.8±0.6	69	7	77	570
	♀♀	24 ч	62*	53.3±0.7	65*	6	69	571
		12 ч	60*	53.9±0.7	67*	5	73	528
		0 ч	73	68.1±0.8	85	6	90	502

Различия с 0 ч освещением статистически значимы: * – $p < 0.001$.

Обозначения: М — медианная продолжительность жизни; СПЖ — средняя продолжительность жизни; 90% — время жизни 90% популяции; min и max — минимальная и максимальная продолжительность жизни в выборке; N — количество особей в выборке; ♂♂ — самцы; ♀♀ — самки. При сравнении медианной продолжительности жизни применяли критерий Гехана-Бреслоу-Вилкоксона, а при анализе времени жизни 90 % популяции — критерий Ванг-Аллисона.

У особей линии *Sod2* с нарушением фермента митохондриальной *Sod* медианная продолжительность жизни при стандартном

режиме снизилась на 28 % у самцов и на 18 % у самок; при круглосуточном режиме освещения – на 38 % у самцов и на 15 % у

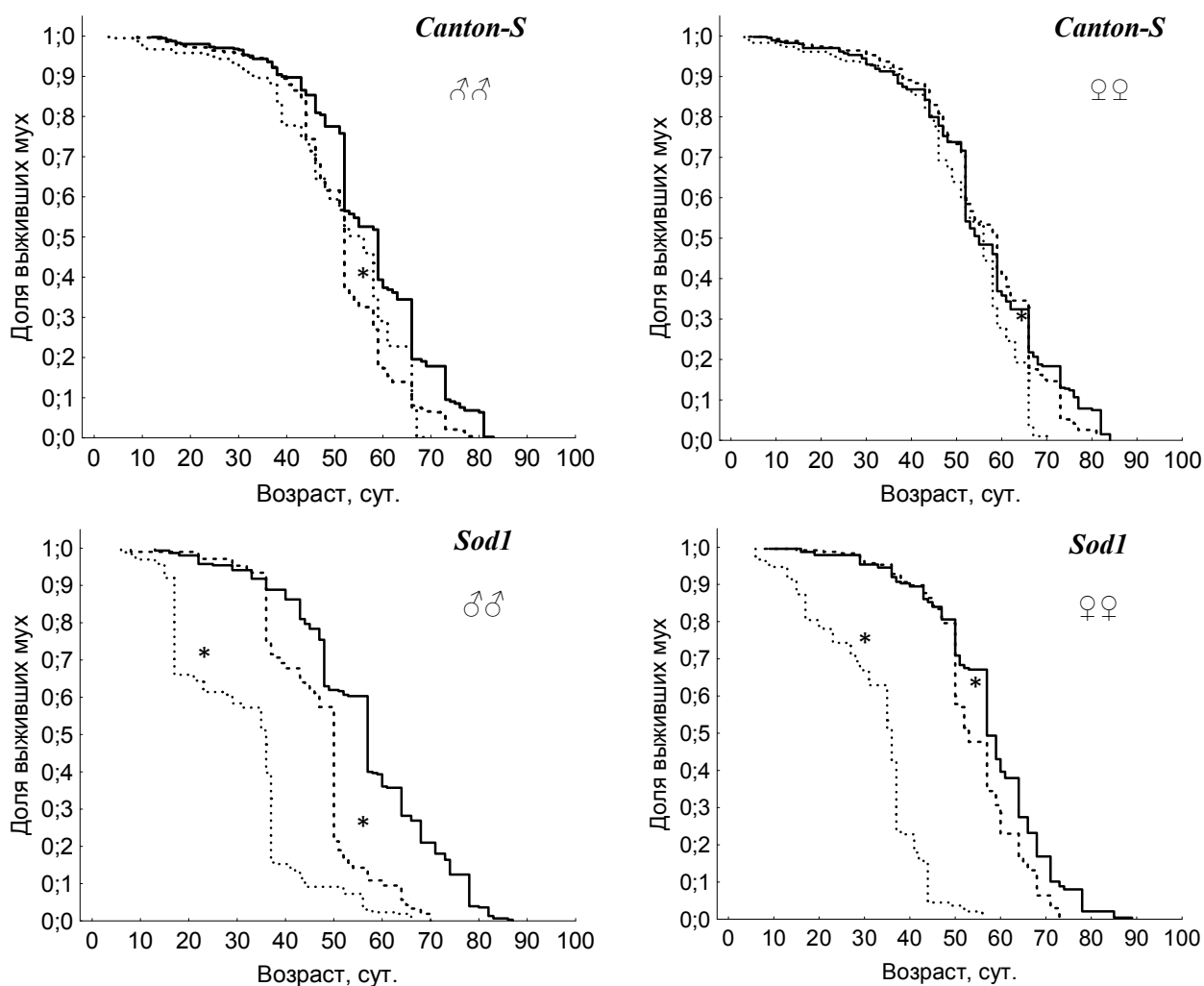
самок. Таким образом, у особей дрозофилы с дефектом в генах *Sod* с увеличением длины светового дня (с 12 ч до 24 ч) наблюдалось более значительное снижение продолжительности жизни. Кроме того, у данных исследуемых линий на свету значительно снижались и другие параметры продолжительности жизни: время 90 %-ной гибели особей, средняя и максимальная продолжительность жизни (см. табл.). Кривые выживаемости особей с нарушением

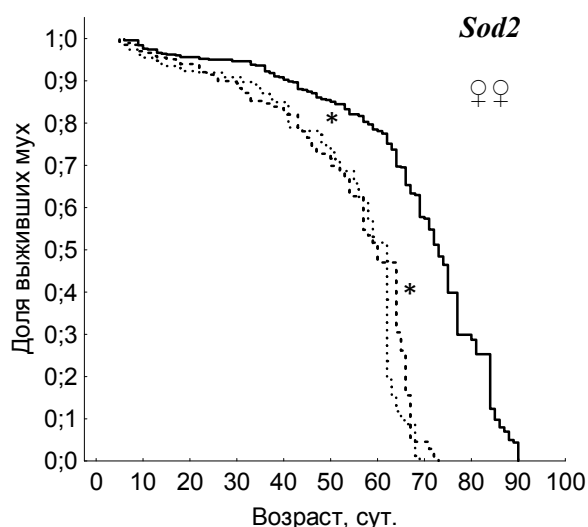
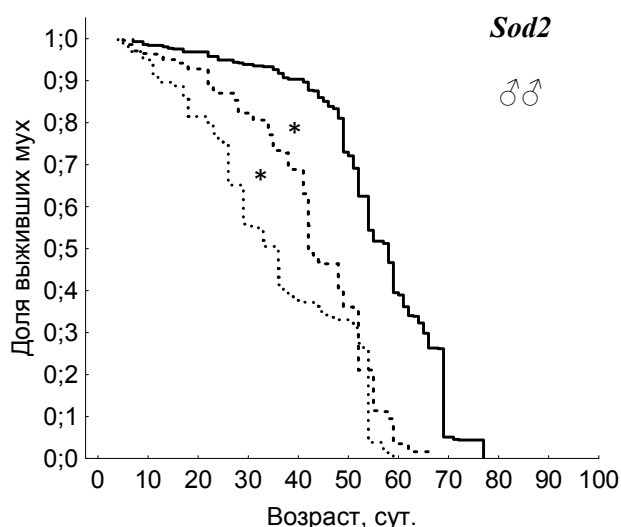
в детоксикации свободных радикалов, содержащихся в условиях круглосуточного режима освещения, находятся значительно ниже кривых выживаемости особей, содержащихся в условиях постоянной темноты или стандартного режима освещения, что свидетельствует об ускоренном старении особей в условиях постоянного освещения. У особей линии дикого типа разрыв в кривых дожития выражен слабо (рис. 1).

Рис. 1.

Кривые выживаемости самцов (♂♂) и самок (♀♀) имаго лабораторных линий дрозофилы при различных режимах освещения (0 ч, 12 ч, 24 ч).

Обозначения: — 0 ч; - - - 12 ч; 24 ч; * – различия с темнотой достоверны при $p < 0.001$ (по критерию Колмогорова-Смирнова).





Заклучение

Согласно нашим результатам особи линий с низкой способностью детоксицировать свободные радикалы оказались более чувствительными к изменению длины светового дня и имели более выраженную разницу между продолжительностью жизни в темноте и на свету по сравнению с линией дикого типа. Таким образом, полученные результаты убедительно свидетельствуют в пользу предположения о том, что определяющим фактором снижения продолжительности

жизни дрозофил при содержании на свету является увеличение выделения свободных радикалов за счет интенсификации метаболизма, при этом гены цитоплазматической и митохондриальной супероксиддисмутазы играют важную роль в устранении эффектов повреждающего действия света.

Исследования поддержаны грантом Президиума РАН № 12-П-4-1005; грантом Президиума УрО РАН для молодых ученых и аспирантов № 13-4-НП-182 и грантом РФФИ № 12-04-31922-мол_а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анисимов В. Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения. – СПб.: Наука, 2003. – 468 с.
2. Ермаков С. П., Гаврилов Н. С. Первичная статистическая обработка данных по выживаемости организмов // Итоги науки и техники. ВИНТИ. Общие проблемы биологии. – 1987. – Т. 6. – С. 230–276.
3. Крутько В. Н., Славин М. Б., Смирнова Т. М. Математические основания геронтологии. – М.: Едиториал УРСС, 2002. – 384 с.
4. Москалев А. А., Малышева О. А. Роль генов транскрипционного фактора dFOXO, dSIR2 и HSP70 в изменении продолжительности жизни *Drosophila melanogaster* при различных режимах освещения // Экологическая генетика. – 2010. – Т. 8. – № 3. – С. 67–80.
5. Москалев А. А., Кременцова А. В., Малышева О. А. Влияние мелатонина на продолжительность жизни *Drosophila melanogaster* при различных режимах освещения // Экологическая генетика. – 2008. – Т. 6. – № 3. – С. 22–30.

6. **Скулачев В. П.** Эволюция, митохондрии и кислород // Соровский образовательный журнал. – 1999. – № 9. – С. 4–10.
7. **Helfand S. L., Rogina B.** Genetics of aging in the fruit fly *Drosophila melanogaster* // Annu. Rev. Genet. – 2003. – Vol. 37. – P. 329–348.
8. **Honda Y, Tanaka M, Honda S.** Redox regulation, gene expression and longevity // Geriatr Gerontol Int. – 2010. – Vol. 10 – P. 59–69.
9. **Le Bourg E.** Oxidative stress, aging and longevity in *Drosophila melanogaster* // FEBS Letters. – 2001. – Vol. 498. – P. 183–186.
10. **Massie H. R, Whitney S. J.** Preliminary evidence for photochemical ageing in *Drosophila* // Mech. Ageing Dev. – 1991. – Vol. 58. – P. 37–48.
11. **Orr W. C., Sohal R. S.** Does overexpression of Cu, Zn-SOD extend life span in *Drosophila melanogaster*? // Experimental gerontology. – 2003. – Vol. 38. – P. 227–230.
12. **Sheeba V., Sharma V. K., Shubha K., Chandrashekar M. K., Joshi A.** The effect of different light regimes on adult life span in *Drosophila melanogaster* is partly mediated through reproductive output // J. Biol. Rhythms. – 2000. – N 5. – P. 380–392.
13. **Sheeba V., Chandrashekar M. K., Joshi A., Sharma V. K.** Developmental plasticity of the locomotor activity rhythm of *Drosophila melanogaster* // J. Insect Physiol. – 2002. – Vol. 48. – P. 25–32.
14. **Staveley B. E., Phillips J. P., Hilliker A. J.** Phenotypic consequences of copper-zinc superoxide dismutase overexpression in *Drosophila melanogaster* // Genome. – 1990. – Vol. 33. – P. 867–872.
15. **Wang C., Li Q., Redden D. T, Weindruch R., Allison D. B.** Statistical methods for testing effects on «maximum lifespan» // Mech. Ageing Dev. – 2004. – Vol. 125. – N 9. – P. 629632.

© O. A. Shostal, A. A. Moskalev

UDC 57 + 57.04

THE INFLUENCE OF DIFFERENT CONDITIONS OF ILLUMINATION ON LIFESPAN OF DROSOPHILA MELANOGASTER LABORATORY STRAINS WITH MUTATIONS IN GENES SUPEROXIDE DISMUTASE

O. A. Shostal, A. A. Moskalev (Syktyvkar, Russia)

Light is a crucial environmental factor influencing on living organisms during their whole lives. The genetic mechanisms of light influence on Drosophila melanogaster lifespan are poorly understood. Article is devoted to research of influence of different conditions of illumination (24 h, 12 h, 0 h) on lifespan of Drosophila strains with defect of the genes of the cytoplasmic (Sod1) and mitochondrial (Sod2) superoxide dismutase. It is demonstrated, that individuals of Drosophila with a low ability detoxify free radicals are characterized by a more significant difference between lifespan in the darkness and in the light in compared with individuals of wild type strain. The increase of the photoperiod (from 12 to 24 hours) leads to reduction of lifespan of individuals with mutations in the investigated genes. The given result indicating that the risk of excessive illumination. It was shown the role of superoxide dismutase genes in regulating lifespan of the Drosophila melanogaster fruit fly in response to change of photoperiod.

Keywords: *lifespan, Drosophila melanogaster, light conditions, superoxide dismutase.*

REFERENCES

1. **Anisimov V. N.** Molecular and physiological mechanisms of aging. St. Petersburg.: Science, 2003. p. 468. In Russia.
2. **Ermakov S. P., Gavrilov N. S.** Primary statistical analysis of data on survival of organisms // Results of Science and Technology. VINITI. Common problems of biology? 1987. vol. 6. pp. 230–276. In Russia.
3. **Krut'ko V. N., Slavin M. B., Smirnova T. M.** Mathematical Foundations of Gerontology. Moscow: Editorial URSS, 2002. pp 384. In Russia.
4. **Moskalev A. A., Kremetsova A. V., Malysheva O. A.** 2008. Melatonin influence on Drosophila melanogaster life span at different light regimes // Ekol. Genet., 2008. N 3. pp. 22–30. In Russia.
5. **Moskalev A. A., Malysheva O. A.** The role of transcription factors DFOXO, DSIR2 and HSP70 in lifespan alteration of Drosophila melanogaster in different light conditions // Ekol. Genet., 2010. N 3. pp. 67–80.
6. **Skulachev V. P.** Evolution, mitochondria and oxygen // Soros Educational Journal, 1999. N 9. pp. 4–10. In Russia.
7. **Helfand S. L., Rogina B.** Genetics of aging in the fruit fly Drosophila melanogaster // Annu. Rev. Genet. – 2003. – Vol. 37. – P. 329–348.
8. **Honda Y, Tanaka M, Honda S.** Redox regulation, gene expression and longevity // Geriatr Gerontol Int. – 2010. – Vol. 10 – P. 59-69.
9. **Le Bourg E.** Oxidative stress, aging and longevity in Drosophila melanogaster // FEBS Letters. – 2001. – Vol. 498. – P. 183–186.

10. **Massie H. R., Whitney S.J.** Preliminary evidence for photochemical ageing in *Drosophila* // *Mech. Ageing Dev.* – 1991. – Vol. 58. – P. 37–48.
11. **Orr W. C., Sohal R. S.** Does overexpression of Cu, Zn-SOD extend life span in *Drosophila melanogaster*? // *Experimental gerontology.* – 2003. – Vol. 38. – P. 227–230.
12. **Sheeba V., Sharma V. K., Shubha K., Chandrashekar M. K., Joshi A.** The effect of different light regimes on adult life span in *Drosophila melanogaster* is partly mediated through reproductive output // *J. Biol. Rhythms.* – 2000. – N 5. – P. 380–392.
13. **Sheeba V., Chandrashekar M. K., Joshi A., Sharma V. K.** Developmental plasticity of the locomotor activity rhythm of *Drosophila melanogaster* // *J. Insect Physiol.* – 2002. – Vol. 48. – P. 25–32.
14. **Staveley B. E., Phillips J. P., Hilliker A. J.** Phenotypic consequences of copper-zinc superoxide dismutase overexpression in *Drosophila melanogaster* // *Genome.* – 1990. – Vol. 33. – P. 867–872.
15. **Wang C., Li Q., Redden D.T, Weindruch R., Allison D.B.** Statistical methods for testing effects on «maximum lifespan» // *Mech. Ageing Dev.* – 2004. – Vol. 125. – N 9. – P. 629–632.

Shostal Olga Andreevna – Ph.D, Research fellow, Institute of Biology of the Komi Scientific Centre of the Ural Division of RAS.

E-mail: olash@list.ru

Moskalev Alexei Alexandrovich – Ph.D., Head of the Laboratory of Molecular Radiobiology and Gerontology, Institute of Biology of the Komi Scientific Centre of the Ural Division of RAS.

© Е. Г. Шубенкова, О. П. Чжу, Ю. Ю. Лобова, И. А. Лутаева

УДК 615.32

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ УСЛОВИЙ ЭКСТРАКЦИИ НА ИЗВЛЕЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ С АНТИОКСИДАНТНЫМИ СВОЙСТВАМИ

Е. Г. Шубенкова, О. П. Чжу, Ю. Ю. Лобова, И. А. Лутаева (Омск, Россия)

В статье представлены результаты исследования антиокислительных свойств растительных экстрактов. Целью работы являлось исследование влияния условий экстракции на извлечение комплекса биологически активных веществ (БАВ). В качестве объектов исследования были выбраны водно-спиртовые и масляные экстракты лекарственных растений (коры дуба, почек березы и др.). Извлечение комплекса БАВ проводили методами многократной двухфазной экстракции и ультразвуковой экстракции. Показателем относительной антиокислительной активности экстракта служил объем экстракта в миллилитрах, израсходованный на титрование 1 мл 0,05 Н раствора перманганата калия. В заключение сделаны выводы о влиянии условий экстракции на содержание биологически активных веществ с антиокислительными свойствами в полученных экстрактах.

Ключевые слова: биологически активные вещества, экстракция, двухфазная экстракция, ультразвук, антиоксиданты, антиокислительные свойства.

Известно, что для торможения нежелательных окислительных процессов применяются синтетические и природные антиоксиданты. Использование синтетических антиокислителей проблематично из-за их токсичности, высокой стоимости, необходимости строгого контроля и т. д. [1]. Природные антиоксиданты, в отличие от

химически синтезированных, не оказывают негативного побочного влияния на организм человека, улучшают качественные характеристики продукта, обогащая его эссенциальными макро- и микронутриентами, более функциональны и стабильны, поэтому могут быть использованы как в пищевой, так и в медицинской промышленности.

* Статья подготовлена по результатам работы Международной научно-практической конференции «Свободные радикалы и антиоксиданты в химии, биологии и медицине» (1-4 октября 2013 г.) в рамках реализации Программы стратегического развития ФГБОУ ВПО «Новосибирский государственный педагогический университет» на 2012–2016 гг.

Шубенкова Екатерина Гаррьевна – кандидат химических наук, доцент кафедры «Физическая химия», Омский государственный технический университет.

E-mail: shubenkova-e@mail.ru

Чжу Ольга Петровна – кандидат химических наук, доцент кафедры «Физическая химия», Омский государственный технический университет.

Лобова Юлия Юрьевна – магистрант кафедры «Нефтехимические технологии и оборудование», Омский государственный технический университет.

Лутаева Ирина Анатольевна – магистрант кафедры «Нефтехимические технологии и оборудование», Омский государственный технический университет.

Наиболее перспективными источниками антиоксидантов считаются растительные объекты, так как растительное сырье богато такими биологически активными веществами как биофлавоноиды, эфирные масла, дубильные вещества, аскорбиновая кислота, которые обладают антиокислительной, антивирусной, антимуtagenной и другими свойствами [2].

Целью работы являлось исследование влияния условий экстракции на извлечение комплекса БАВ. В качестве объектов исследования выбраны водно-спиртовые и масляные экстракты лекарственных растений (коры дуба, почек березы и др.).

Извлечение комплекса БАВ проводили методами многократной двухфазной экстракции на лабораторном экстракторе и ультразвуковой экстракции. Согласно проведенным теоретическим и экспериментальным исследованиям по подбору оптимальных условий двухфазной экстракции [3], экстракцию проводили при комнатной температуре, концентрации этилового спирта 40 %, соотношении спирт:

растительное масло 1:2 и интенсивности перемешивания 3000 об/мин.

При проведении ультразвукового извлечения БАВ учитывали, что с одной стороны ультразвук может изменить активность извлекаемых БАВ, с другой – может способствовать разрушению компонентов. Извлечение проводили при ультразвуковой обработке (с частотами $2 \cdot 10^4$ – $2 \cdot 10^8$ с⁻¹) мощностью 80 Вт.

Эквивалентной оценкой биохимической активности экстрактов является определение их общей антиокислительной активности (АОА). Показателем относительной АОА служит объем экстракта в миллилитрах, израсходованный на титрование 1 мл 0,05 Н раствора перманганата калия. Чем меньше объем препарата, израсходованный на титрование, тем выше антиокислительная активность препарата.

Количественной характеристикой является АОА объектов. Влияние времени двухфазной экстракции на извлечение БАВ с антиокислительными свойствами приведены в табл. 1 и на рис. 1.

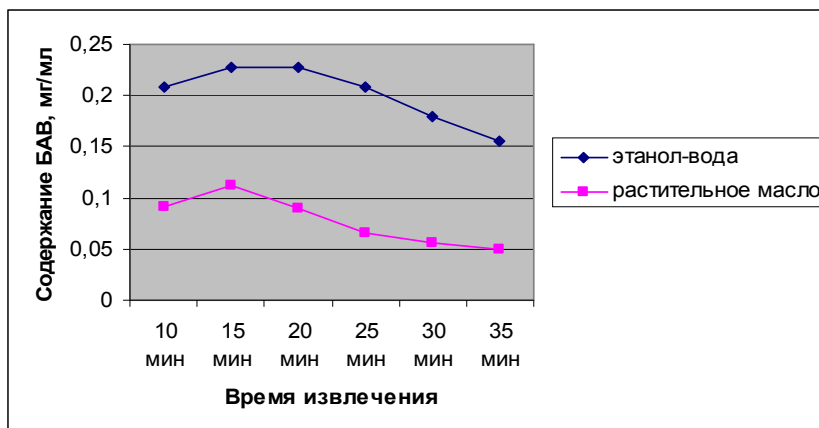
Таблица 1

Влияние времени экстракции на извлечение биологически активных веществ восстановительного характера

Время извлечения	Содержание БАВ, мг/мл	
	этанол-вода	растительное масло
10 мин	0,208	0,091
15 мин	0,227	0,112
20 мин	0,227	0,089
25 мин	0,208	0,066
30 мин	0,179	0,056
35 мин	0,156	0,05

Рис. 1.

Влияние времени двухфазной экстракции на извлечение биологически активных веществ с антиокислительными свойствами.



Результаты исследований показали, что при времени экстракции 15-20 минут извлекается наибольшее количество биологически активных веществ. При увеличении времени экстракции содержание биологически активных веществ с восстановительными свойствами снижается, вероятно, из-за их частичного окисления кислородом воздуха при интенсивном

перемешивании. Антиокислительная активность водно-спиртовых экстрактов больше масляных в 2-3 раза, что говорит о полярности молекул.

Сравнительные результаты влияния двухфазной экстракции и УЗ двухфазной экстракции на биохимическую (антиокислительную) активность экстрактов приведены в табл. 2.

Таблица 2

Влияние метода извлечения на биохимическую (антиокислительную) активность экстрактов

Метод извлечения		Содержание суммы восстанавливающих БАВ в экстракте, мг/г	
		этанол	растительное масло
Многokратная двухфазная экстракция (5 этапов по 15 мин)		32,7	34,3
Ультразвуковая экстракция (1 этап 15 мин)	3 мин	28,0	28,3
	5 мин	26,5	36,0
	7 мин	26,1	38,3
	10 мин	35,3	36,7
	15 мин	26,5	28,3
	20 мин	24,9	23,0

По данным табл. 2 можно сделать вывод, что биохимическая активность исследованных экстрактов БАВ достигает максимального значения при УЗ обработке в течение 7-10 мин. При более длительной УЗ обработке происходит уменьшение количества антиоксидантов в экстракте, возможно из-за частичной деструкции БАВ.

Таким образом, на основе экспериментальных данных установлено, что использование ультразвука (УЗ) приводит к увеличению содержания суммы

антиоксидантов в растительных экстрактах и тем самым повышает эффективность процесса экстракции. Определено оптимальное время УЗ воздействия, которое в данной работе составило 7-10 мин. В этом случае биохимическая активность исследованных экстрактов БАВ достигает максимального значения.

Полученные экстракты стабильны и сохраняют свои антиокислительные свойства в течение длительного времени (более 60 суток).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бердимуратова Г. Д. и др. Биологически активные вещества растений: выделение, разделение, анализ. – Алматы : Изд-во КазНУ, 2006. – 438 с.
2. Максимова Т. В., Никулина И. Н., Пахомов В. П., Шкарина Е. И. и др. Способ определения антиокислительной активности. – Патент РФ RU 2170930. – Московская медицинская академия им. И. М. Сеченова. – Москва, 2000.
3. Shubenkova E. G., Chzhu O. P. «Biochemical developments of extractions of biologically active substances». Applied and Fundamental Studies : Proceedings of the 2nd International Academic Conference. March 8-10, 2013, St. Louis, USA. Publishing House "Science & Innovation Center", 2013. Pp. 55–59.

© E. G. Shubenkova, O. P. Chzhu, J. Y. Lobova, I. A. Lutaeva

UDC 615.322

STUDY THE INFLUENCE OF EXTRACTION CONDITIONS ON ELICITATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES WITH ANTIOXIDANT PROPERTIES

E. G. Shubenkova, O. P. Chzhu, J. Y. Lobova, I. A. Lutaeva (Omsk, Russia)

The paper presents the results of a study of antioxidant properties of plant extracts. The aim of the work was to study the effect of extraction conditions on the extraction of biologically active substances (BAS). The objects of investigation were water-alcohol and oil extracts of medicinal plants. Removing a complex of biologically active substances was performed by repeated two-phase extraction and ultrasonic extraction. The relative antioxidant activity of the extract was indicated as volume of extracts in milliliters, consumed for the titration of 1 ml of 0.05 N solution of potassium permanganate. Finally, conclusions are drawn on the impact of the extraction conditions on the content of biologically active substances with antioxidant properties in the resulting extracts.

Keywords: *biologically active substances, two-phase extraction, ultrasound, antioxidants, antioxidant properties.*

REFERENCES

1. **Berdimuratov G. D.** [et all]. Biologically active substances of plants: isolation, separation, analysis. – Almaty: Kazakh National University Publishing House, 2006. – 438 p.
2. **Maximova T. V., Nikulin I. N., Pakhomov V. P., Shkarina E. I. etc.** Method of antioxidant activity determination. – Patent RU 2170930. – Moscow Medical Academy I. M. Sechenov. – Moscow, 2000.
3. **Shubenkova E. G., Chzhu O. P.** «Biochemical developments of extractions of biologically active substances». Applied and Fundamental Studies: Proceedings of the 2nd International Academic Conference. March 8-10, 2013, St. Louis, USA. Publishing House «Science & Innovation Center», 2013. Pp. 55–59.

Shubenkova Ekaterina Garryevna – Ph.D., assistant professor of «Physical Chemistry», Omsk State Technical University.

E-mail: shubenkova-e@mail.ru

Chzhu Olga Petrovna – Ph.D., assistant professor of «Physical Chemistry», Omsk State Technical University.

Lobova Julia Yryevna – master student chair «Petrochemical technology and equipment», Omsk State Technical University.

Lutaeva Irina Anatolyevna – master student chair «Petrochemical technology and equipment», Omsk State Technical University.

CONTENTS

BIOLOGICAL, CHEMICAL, MEDICAL SCIENCES

Yagunov S.E., Kholshin S.V., Kandalintseva N.V. (Novosibirsk, Russia). Alkylpyrocatechols: synthesis and antiradical activity	5
Bogatyrenko T.N., Konovalova N.P., Sipjagin A.M., Bogatyrenko V.R., Kuroptva Z.V., Baider L.M., Sashenkova T.E., Vedorov B.S. (Chernogolovka, Moscow Region, Moscow, Russia). Intensification of anti-cancer chemo-therapy effect of cyclophosphamid by using a hybrid anti-inflammatory drug – nitrate salt of diclofenac hydroxamic acid	13
Burlaka I. B., Gryn' N.V., Verevka S.V. (Kiev, Ukraine). Plasma free amino acid profile in patients with oral cancer	23
Davidovsky A.G. (Minsk, Belarus). System analysis of the effectiveness of compositions of antioxidants in low doses for the correction of oxidative stress at toxic-septic conditions.....	32
Zhusupova G.E., Shalakhmetova T.M., Murzakhmetova M.K., Gadetskaya A.V., Zhusupova A.I. (Almaty, Republic of Kazakhstan). Antioxidant activity of some preparations, obtained on the basis of Kazakhstani plants	43
Ibragimov U.K. (Tashkent, Uzbekistan). Experimental stroke: different affect of treatment with antioxidant and antihypoxant drugs	66
Kolesnikov A.V., Barenina O.I., Schulkin A.V. (Ryazan, Russia). Activity of lipid peroxidation and condition of lens antioxidant system on the experimental cataract against the background of local antioxidants	70
Kuchmenko O.B. (Kiev, Ukraine). Biochemical properties of ubiquinone function under experimental pathological conditions of cardiovascular system	79
Murotov O.U., Ibragimov U. K. (Tashkent, Uzbekistan). The treatment with antioxidant drugs of experimental stroke: morphological changes in tissue of brain	95
Panin L. E., Mokrushnikov P.V. (Novosibirsk, Russia). Effects of synthetic vitamin E derivative on the rheological properties of red blood cell membranes	101
Petrosyan T.R., Gevorgyan O.V. (Yerevan, Armenia). Effects of bacterial melanin on posttraumatic recovery of motor tract conduction in rats	111
Ruziev F.Sh., Murotov O.U., Ibragimov U. K. (Tashkent, Uzbekistan). Antioxidant system of subcellular fraction of hepatocytys after experimental stroke.....	122
Russkikh I.V., Pisareva S.I., Ryabova N.V. (Tomsk, Russia). Spectral manifestation of interaction between hydroxyl groups of phenolic antioxidants and solvents	128
Shostal O.A., Moskalev A.A. (Syktyvkar, Russia). The influence of different conditions of illumination on lifespan of drosophila melanogaster laboratory strains with mutations in genes superoxide dismutase	136
Shubenkova E.G., Chzhu O.P., Lobova J.Y., Lutaeva I.A. (Omsk, Russia). Study the influence of extraction conditions on elicitation of biologically active substances with antioxidant properties	144